

Tese de Doutoramento

**DETERMINANTES GENÉTICOS
IMPLICADOS NA
FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME
DA APNEIA OBSTRUTIVA DO
SONO (SAOS)**

Luis Manuel Duarte Martins Da Silva

*Departamento de Farmacologia
Faculdade de Medicina e Dentaria*

SANTIAGO DE COMPOSTELA 2015





D. MANUEL FREIRE-GARABAL NÚÑEZ, Dña. SILVIA NOVÍO MALLÓN y Dña. MARÍA JESÚS NÚÑEZ IGLESIAS

INFORMAN:

Que LUIS MANUEL DUARTE MARTINS DA SILVA licenciado en Odontología ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “DETERMINANTES GENÉTICOS IMPLICADOS NA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO (SAOS)”, que cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el oportuno Tribunal para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Santiago de Compostela a 4 de Noviembre de 2015.

Fdo.: Manuel Freire-Garabal Núñez

Fdo.: Silvia Novío Mallón

Fdo.: M^a Jesús Núñez Iglesias

Fdo.: Luis Manuel Duarte Martins Da Silva



AGRADECIMENTOS

A concretização deste projeto resulta da contribuição de outras pessoas e do apoio de várias Instituições. Por isso, expresso aqui os meus agradecimentos:

À CESPU, Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU, CRL), entidade que me permitiu desde os meus primeiros anos como aluno de Medicina Dentária (e continua a permitir) aprender, ensinar e investigar. Aos meus professores, aos meus colegas de trabalho e aos meus alunos fonte de inspiração, motivação e de orgulho profissional e académico. A todos aqueles que fazem parte desta Instituição e principalmente àqueles que diariamente trabalham comigo um muito obrigado.

Ao Centro Hospitalar do Porto - Hospital de Santo António (CHP-HSA), os trabalhos realizados no âmbito desta tese que se iniciaram na Consulta de Sono do CHP-HSA, na qual são seguidos os doentes com Apneia Obstrutiva de Sono (SAOS). Agradeço aos doentes e familiares a colaboração nos trabalhos.

Ao Serviço de Neurofisiologia do CHP-HSA, nomeadamente aos Diretores do Serviço, aos médicos, aos técnicos e aos administrativos por todo o apoio e a compreensão.

Um obrigado especial ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), e aos seus colaboradores pela realização dos estudos genéticos em doentes e controlos. A qualidade e capacidade de trabalho da equipa deste Laboratório, a sua disponibilidade, competência e dedicação à investigação clínica permitiram criar um grupo de trabalho multidisciplinar.

Ao Prof. Doutor Paulo Pinho Costa e à Prof^a. Doutora Carolina Lemos pela ajuda, críticas e sugestões dadas a este trabalho.

Ao Prof. Doutor Manuel Freire-Garabal Núñez, meu orientador, pela amizade, rigor e pelo apoio dado a este projeto.

À Prof^a. Doutora Silvia Novío Mallón, minha co-orientadora, pela amizade, constante procura da exigência e rigor em todo o trabalho de investigação e pelo apoio dado a este projeto.

À Prof^a. Doutora Maria de Jesús Núñez Iglesias, minha co-orientadora, pelo apoio e exigência dados a este projeto.

Ao Prof. Doutor António Manuel de Almeida-Dias, meu professor desde os anos de Faculdade, uma enorme gratidão por me ter ensinado o rigor, por me ter incentivado a procurar sempre mais e melhor, e acima de tudo pela amizade e companheirismo que tem demonstrado.

Às editoras das revistas científicas, agradeço as autorizações para a reprodução dos artigos nesta Tese.

Espero que este trabalho possa contribuir para ajudar a tratar melhor os doentes, e me permita continuar a aprender, ensinar e investigar.

À minha Avó, à minha irmã, aos meus sogros e a toda a minha família e amigos.....
Um profundo obrigado por me terem acompanhado nesta caminhada e por toda a ajuda que me proporcionaram.

Aos meus Pais a incansável ajuda e carinho que me tem permitido ultrapassar os diversos obstáculos ao longo da vida.



Uma dedicatória especial à Rita e aos nossos filhos Francisco, João e Maria, por toda a amizade, carinho, amor e compreensão que têm demonstrado ao longo destes anos e principalmente nos momentos mais difíceis....



ÍNDICE

RESUMO	17
SUMMARY	21
RESUMEN	25
1. CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	29
1.1. O SONO COMO PROCESSO FISIOLÓGICO FUNDAMENTAL PARA A HOMEOSTASIA.....	31
1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS CICLOS DE SONO	34
1.1.1.1. O SONO REM.....	38
1.1.1.2. O SONO NREM	40
1.1.2. RELÓGIO BIOLÓGICO CIRCADIANO EM HUMANOS	44
1.1.3. REGULAÇÃO DE VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS DURANTE O SONO	46
1.1.3.1. RESPIRAÇÃO.....	46
1.1.3.2. FREQUÊNCIA CARDÍACA	47
1.1.3.3. PRESSÃO ARTERIAL.....	48
1.1.3.4. TEMPERATURA	48
1.1.3.5. FUNÇÕES ENDÓCRINAS	48
1.2. PATOLOGIAS DO SONO.....	50
1.3. ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM SONO.....	51
1.3.1. EVOLUÇÃO DO CONHECIMENTO DAS ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM SONO	51
1.3.2. AS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS RELACIONADAS COM O SONO: TIPOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO	52
1.3.2.1. A APNEIA OBSTRUTIVA EM SONO	53
1.3.2.1.1. DEFINIÇÃO	53
1.3.2.1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	55
1.3.2.1.3. DIAGNÓSTICO	57
1.3.2.1.4. ETIOPATOGENIA.....	62
1.3.2.2. FATORES DE RISCO DA SAOS E COMORBILIDADES	63
1.3.2.2.1. SAOS E OBESIDADE.....	64
1.3.2.2.2. SAOS E ESTRUTURAS CRANIOFACIAIS.....	68
1.4. DETERMINANTES GENÉTICOS DA SAOS	74
1.4.1. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCETIBILIDADE EM DOENÇAS COMPLEXAS	74
1.4.2. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCETIBILIDADE PARA A SAOS	75
2. CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	81
3. CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS	85
3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA	87
3.2. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA.....	88
3.3. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL	89
3.3.1. SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DOS MARCADORES GENÉTICOS.....	89
3.3.2. ESTUDO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	89
3.3.3. QUANTIFICAÇÃO DO ADN.....	89

3.3.4.	TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	90
3.3.5.	GENOTIPAGEM DOS <i>SINGLE NUCLEOTIDES POLYMORPHISMS</i>	90
3.3.6.	IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS HLA	91
3.3.7.	IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA APOLIPROTEINA E	92
3.3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	92
3.3.8.1.	PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	92
3.3.8.2.	ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO	92
3.3.8.3.	EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	94
3.3.8.4.	META-ANÁLISE	94
4.	CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	97
4.1.	ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICOS	100
4.1.1.	SEXO E IDADE	100
4.1.2.	DISTRIBUIÇÃO POR ÍNDICE DE MASSA CORPORAL.....	101
4.1.3.	HISTÓRIA FAMILIAR	103
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS DOENTES COM SAOS	103
4.2.1.	DISTRIBUIÇÃO POR SEXO E IDADE	103
4.2.2.	DISTRIBUIÇÃO POR ÍNDICE DE MASSA CORPORAL.....	105
4.2.3.	HÁBITOS DE SONO (NÚMERO DE HORAS DE SONO POR DIA)	106
4.2.4.	HISTÓRIA FAMILIAR	106
4.2.5.	CORREÇÃO ORTODÔNTICA	107
4.2.6.	CIRURGIA ÀS AMÍGDALAS	107
4.3.	SAOS E COMORBILIDADES	108
4.4.	ESTUDOS GENÉTICOS	115
4.4.1.	INFORMAÇÃO DOS GENES	115
4.4.2.	ESTUDO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS (SNP(S)) RELACIONADOS COM A OBESIDADE, ESTRUTURA CRANIOFACIAL, TECIDOS MOLES E OUTROS NA SUSCETIBILIDADE À SAOS	116
4.4.2.1.	GENES ASSOCIADOS À OBESIDADE.....	118
4.4.2.1.1.	ALELOS	118
4.4.2.1.2.	GENÓTIPOS	118
4.4.2.1.3.	HAPLÓTIPOS	118
4.4.2.2.	GENES ASSOCIADOS AOS TECIDOS MOLES	119
4.4.2.2.1.	ALELOS	119
4.4.2.2.2.	GENÓTIPOS	119
4.4.2.2.3.	HAPLÓTIPOS	119
4.4.2.3.	GENES ASSOCIADOS À ESTRUTURA CRANIOFACIAL	119
4.4.2.3.1.	ALELOS	119
4.4.2.3.2.	GENÓTIPOS	120
4.4.2.3.3.	HAPLÓTIPOS	120
4.4.2.4.	OUTROS GENES ESTUDADOS.....	121
4.4.2.4.1.	ALELOS	121
4.4.2.4.2.	GENÓTIPOS	121
4.4.2.4.3.	HAPLÓTIPOS	122
4.4.2.5.	ANÁLISE NO FUNC-PRED	122
4.4.3.	ESTUDOS DE HLA	122

4.4.3.1.	SAOS E HLA-DR3	122
4.4.3.2.	SAOS E HLA-A2	126
4.4.3.3.	SAOS E APOE	128
5.	CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO.....	133
5.1.	RELAÇÃO ENTRE SAOS, OBESIDADE E RISCO DE COMORBILIDADES	136
5.2.	RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS (SNP'S) E SAOS	138
5.2.1.	GENES ASSOCIADOS À OBESIDADE	138
5.2.2.	GENES ASSOCIADOS AOS TECIDOS MOLES	138
5.2.3.	GENES ASSOCIADOS À ESTRUTURA CRANEOFACIAL.....	138
5.2.4.	OUTROS GENES ASSOCIADOS	139
5.3.	RELAÇÃO ENTRE GENES DO SISTEMA HLA E SAOS	140
5.3.1.	ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO HLA- DRB1*03 E SAOS.....	140
5.3.2.	ESTUDO DA RELAÇÃO HLA- A*02 E SAOS	142
5.4.	RELAÇÃO ENTRE GENES DA APOE E A SAOS.....	143
6.	CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES.....	145
7.	CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFIA	149
8.	CAPÍTULO 8. ANEXOS.....	167
8.1.	CONSENTIMENTO INFORMADO.....	169
8.2.	INQUÉRITO	170
8.3.	PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES DERIVADAS DESTA TESE	172
8.3.1.	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS EM REVISTAS PEER REVIEWED	172
8.3.2.	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ENVIADAS PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTAS PEER REVIEWED.....	186
8.3.3.	TRABALHOS APRESENTADOS NO 22ND CONGRESS OF THE EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY (ESRS) EM TALLINN 2014.	219
8.3.4.	TRABALHOS APRESENTADOS NO 5TH WORLD CONGRESS ON SLEEP OF THE WORLD ASSOCIATION OF SLEEP MEDICINE (WASM) EM VALÊNCIA 2013.....	223
8.3.5.	TRABALHOS APRESENTADOS NO 20ND CONGRESS OF THE EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY (ESRS) EM LISBOA 2010.	225
8.4.	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES CANDIDATOS E SNPS SELECIONADOS EM FUNÇÃO DOS FENÓTIPOS.....	231
8.5.	INFORMAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS SELECIONADOS	234



GLOSSÁRIO

AASM - American Academy of Sleep Medicine

Ach - Acetilcolina

ACTH - Adrenocorticotropic Hormone

ACROFASE – Momento de Amplitude Máxima da Curva de Um Ritmo Biológico

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AHI - Apnea–hypopnea índice

APOE - Apolipoproteína E

APSS - Associated Professional Sleep Societies

Arg - Arginina

ASDA - American Sleep Disorders Association

ASDC - Association of Sleep Disorders Centers

CCHS - Congenital Central Hypoventilation Syndrome

CGA - Candidate Gene Approach

CO₂ - Dióxido de Carbono

CT scan - Computerized Tomography scan

Cys - Cysteine (Cisteína)

ADN - Deoxyribonucleic Acid

DP - Desvio-padrão

EMBASE - Comprehensive Biomedical Literature Database, Elsevier

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid

EEG - Electroencefalografia

EMG - Electromiografia

EOG - Electro-oculografia

EOG-L - Electro-oculografia ao olho esquerdo

EOG-R - Electro-oculografia ao olho direito

GH - Growth Hormone / Hormona de Crescimento

GWA - Genome Wide Association

HLA - Human Leukocyte Antigen

HSA/CHP - Hospital de Santo António/Centro Hospitalar do Porto

HTA - Hipertensão Arterial

HTR2A - Hydroxytryptamine (serotonin) Receptor 2A

HWE - Hardy-Weinberg Equilibrium
IAH - Índice de Apneias e Hipopneias por hora
IC - Intervalo de Confiança
ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
ICSD - International Classification of Sleep Disorders
ICSD 3 - International Classification of Sleep Disorders - versão 3
IGF1R - Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-6 - Interleucina 6
IMC - Índice de Massa Corporal
LDL - Low Density Lipoprotein
MEDLINE - Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
MeSH - Medical Subject Headings
MHC - Major Histocompatibility Complex
NCBI - National Center for Biotechnology Information
nCPAP - nasal Continuous Positive Airway Pressure
NREM - Non-Rapid Eye Movement
NREM2 - Non-Rapid Eye Movement Phase 2
NREM3 - Non-Rapid Eye Movement Phase 3
O₂ - Oxigénio
OMS / WHO - Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
OR - Odds Ratio
PC - População Controlo
PCR - Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP - PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR-SSP - PCR-Sequence-specific primers
REM - Rapid Eye Movement / Movimentos Oculares Rápidos
SAOS - Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono
SDB - Sleep Disorder Breathing
SM - Síndrome Metabólico
SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de Base Única)
S-REM – Sono REM (Sono de movimentos oculares rápidos)

SNREM – Sono não REM

TE - Tris-EDTA

TGF1 - Transforming Growth Factor 1

TNF α - Tumor Necrosis Factor α

TSH - Thyroid Stimulating Hormone

TTS - Tempo Total em Sono

VLDL - Very Low Density Lipoprotein





RESUMO

A síndrome de apneia obstrutiva de sono (SAOS) é uma entidade clínica muito frequente e prevalente para a qual, e apesar dos avanços científicos no diagnóstico e tratamento, ainda hoje tem uma etiopatogenia não completamente esclarecida. Desde logo porque mesmo tendo alta prevalência na população em geral (4% no sexo masculino e 2% no sexo feminino), a SAOS é frequentemente assintomática. O reconhecimento clínico da SAOS é especialmente importante porque é uma patologia com graves consequências na morbilidade podendo constituir um fator de descompensação de outras doenças e determinar (pela perturbação do sono que induz e consequente hipersónia) aumentos de mortalidade direta ou indiretamente, já que a consequente hipersónia determina acidentes, tornando-se assim um importante problema de Saúde Pública.

A identificação das características clínicas, morfológicas e genéticas preditivas do aparecimento desta patologia poderá contribuir para uma significativa melhoria na definição de grupos de risco para os quais se poderão tomar medidas preventivas.

A obesidade nomeadamente cervical, e as alterações da estrutura craniofacial, muscular e óssea, têm sido descritas como fatores implicados na etiologia da SAOS. Vários estudos têm tido o objetivo de relacionar estes fatores etiológicos (especialmente a obesidade e as alterações das estruturas craniofaciais) com as características genéticas individuais. No entanto, os trabalhos publicados não têm apresentado resultados concordantes.

No sentido de poder contribuir para a interpretação da fisiopatologia da SAOS investigamos as características genéticas e morfológicas de pacientes com SAOS que ajudem à identificação de fatores etiológicos, a definir de uma forma mais eficaz as populações em risco e, consequentemente, ajudar ao diagnóstico e eventual prevenção/tratamento desses grupos populacionais.

Neste trabalho procuramos responder aos objetivos gerais que são o de caracterizar uma população com SAOS e identificar fatores individuais (nomeadamente obesidade e risco de comorbilidades) e o papel de fatores genéticos (alelos HLA e APOE) e dos polimorfismos genéticos (de genes relacionados com a obesidade, estrutura craniofacial, e os “tecidos moles”) na suscetibilidade à SAOS.

Tais objetivos permitem responder a questões fundamentais para o entendimento da fisiopatologia da SAOS. Questões essas que procuram saber se existem fatores individuais

geneticamente determinados que estão associados à SAOS ou que são mais comuns em doentes com SAOS e se esses fatores atuam isoladamente ou têm de estar associados, para a SAOS se manifestar.

Do universo de doentes estudados prospetiva e consecutivamente na consulta de sono de um Hospital Central, foram referenciados 324 indivíduos que potencialmente preenchiam os seguintes requisitos: necessidade de registo poligráfico noturno por suspeita de sofrerem de patologia do sono. SAOS, roncopatia, narcolepsia, movimentos periódicos ou outras patologias foram identificadas segundo os critérios da classificação da American Academy of Sleep Disorders (ICSD 3). Deste completaram os diversos estudos 284 pacientes com diversas patologias dos quais 145 tinham SAOS sendo que, destes, 128 tiveram o estudo completo das variáveis associadas à SAOS.

Todos os pacientes foram registados durante uma noite de sono com estudo vídeo-poligráfico que incluiu variáveis da atividade cerebral, movimento, estudos respiratórios e comportamentais de acordo com *standards* existentes. Após o registo foram efetuadas colheitas de sangue para estudos genéticos. Estes estudos genéticos foram dirigidos à identificação de alelos HLA, Genotipagem dos *Single Nucleotides Polymorphisms* e identificação das isoformas da APOE.

Estudamos a importância dos fatores individuais (sexo, índice de massa corporal) e comorbilidades na associação com SAOS e na gravidade da mesma, esta definida como ligeira, moderada ou grave, de acordo com o índice de apneia-hipopneia por hora.

Para validação dos resultados usamos análise estatística diversificada em função do tipo de estudo efetuado (*software* SPSS). Para a validação dos resultados dos estudos genéticos utilizamos também *software* específico (Haploview, SNPator, FuncPred). Para os estudos da relação com os genes da APOE, e dadas as discrepâncias dos estudos prévios, efetuamos uma meta-análise para validação dos resultados encontrados. Todos os valores encontrados foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0.05$.

A população (geral) estudada era maioritariamente do sexo masculino, numa proporção de 2:1, com uma idade média, à data do estudo, de 52 anos.

A população com SAOS era predominantemente do sexo masculino, numa proporção de 6:1, com uma idade média, à data do estudo, de 54,5 anos, com um índice de massa corporal médio de 29.3.

Comparando os dados dos doentes com SAOS e doentes com outras patologias de sono (sem perturbação respiratória) encontramos diferenças no que respeita à presença de comorbilidades, sendo claramente maior (75% vs. 61%) nos doentes com SAOS. A obesidade foi encontrada em 56% dos doentes com comorbilidades e em 84% dos doentes com índice de apneia grave.

A análise dos polimorfismos genéticos para a Obesidade, Estrutura Craneofacial e Tecidos Moles evidenciou que há genes que estão significativamente associados à SAOS. Esses genes são essencialmente os que codificam para a Obesidade (SERPINE1 e LEPR), para os Tecidos Moles (CKM), para a Estrutura Craneofacial (FGFR2 e TGFB1) e nos Outros Genes Associados (PON1, TGFB1 e LEPR).

Na relação entre os genes do complexo HLA e a SAOS demonstramos que há uma associação significativa com o alelo HLA-DRB1*03 não sendo a obesidade que determina tal associação. No que respeita às relações entre o alelo HLA-A*02 e a SAOS encontramos uma associação com as formas menos graves de SAOS (50% nas apneias ligeiras e 53% nas apneias moderadas) o que pode sugerir que este alelo possa ser um marcador do melhor prognóstico para as formas mais graves de SAOS.

Do nosso estudo, e da comparação efetuada pela meta-análise desenvolvida, concluímos que as frequências genotípicas dos alelos ApoE nos doentes com SAOS, nos doentes com outras doenças do sono e na população controlo, não apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo que o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ é o mais representado em todos os grupos e os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 4$ e o $\epsilon 4/\epsilon 4$ estão ausentes no grupo de doentes com SAOS ou com outras doenças de sono.

Dos estudos efetuados concluímos: que a obesidade e as comorbilidades integradas no espectro das alterações metabólicas, são entidades frequentemente associadas à SAOS, independentemente da gravidade da doença, sendo a obesidade um fator determinante no agravamento do quadro clínico; que o alelo HLA- DRB1*03 é um fator de suscetibilidade para a ocorrência da SAOS e que o sexo masculino e a obesidade constituem fatores de risco para a SAOS; que o alelo HLA-A*02 não é um fator de suscetibilidade para a SAOS sendo provavelmente um fator de proteção para os quadros de SAOS mais grave; que alguns dos polimorfismos genéticos para a obesidade, estrutura craneofacial e tecidos moles evidenciam que há genes que, quando presentes, estão significativamente associados à SAOS; e que não existe uma associação significativa entre os genes da ApoE e o risco de SAOS. Estas

conclusões corroboram a ideia inicial e confirmam a SAOS como uma entidade clínica complexa para a qual contribuem fatores individuais diversos aos quais se associam determinantes genéticos, uns e outros, implicados na fisiopatologia deste quadro clínico.



SUMMARY

The obstructive sleep apnea syndrome (OSA or OSAS) is a very common and prevalent clinical entity for which, in spite of scientific advances in diagnosis and treatment, still has an etiology that is not fully known. Firstly because even with a high prevalence in the general population (4% in men and 2% in women), OSA is often asymptomatic. The clinical recognition of OSAS is particularly important because it is a condition with severe consequences on morbidity and can be a decompensation factor for other diseases and determine (by the sleep disorder that induces consequent hypersomnia) direct or indirectly increase of mortality, since the resulting hypersomnia determines accidents, making up OSAS an important public health problem.

Identification of clinical, morphological and genetic features predictive of the onset of this condition can contribute to a significant improvement in the definition of risk groups for which it should be taken preventive measures.

A particularly increase of cervical obesity and changes in craniofacial, muscle and bone structure, have been described as factors involved in the etiology of OSAS. Several studies have been intended to relate these etiologic factors (especially obesity and changes in craneofacial structures) with individual genetic characteristics. However, published studies have not shown consistent results.

In order to contribute to the interpretation of the pathophysiology of OSA we investigate the genetic and morphological characteristics of OSA patients that could help to identify etiological factors; to define in a more effective way the populations at risk and, therefore, to help to assist the diagnosis and prevention / treatment of these population groups.

In this work we try to answer the general objectives that are to characterize a population with OSAS and identify individual factors (such as obesity and risk of co-morbidities) and the role of genetic factors (HLA and APOE alleles) and to assess the importance of genetic polymorphisms (gene related to obesity, craniofacial structure, and the "soft tissues") in the susceptibility to OSAS.

These objectives allow to answer same fundamental questions for understanding the pathophysiology of OSA. These questions seek to know whether there are genetically determined individual factors that are associated with OSAS or which are more common in

patients with OSA and whether these factors act alone or have to be linked to have the manifestation of OSA.

From the universe of patients studied prospectively and consecutively in a Sleep Outpatient Clinic of a Central Hospital, were referred 324 individuals that potentially met the following requirements: the need for night polygraphic recording on suspicion of suffering from sleep disorder: OSA, snoring, narcolepsy, periodic limb movements or other sleep diseases were identified according to the criteria of classification of the American Academy of Sleep Disorders (ICSD 3). From those 284 patients completed the multiple studies with various diseases of which 145 had OSA, and of these 128 had complete all the features for the study of OSA.

All patients were recorded during a night sleep with video polygraphic study involving variables of brain activity, movement, breathing and behavioral studies, according to standards. After registration blood samples were taken for genetic studies. These genetic studies were directed to identify HLA allele, to the Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms, and to the identification of the isoforms of APOE.

We study the importance of individual factors (gender, body mass index) and comorbidities in association with OSA and the severity of it, defined as mild, moderate or severe, according to the apnea-hypopnea index per hour.

To validate the results we use diverse statistical analysis depending on the type of study performed (SPSS software, version 22, SPSS Inc.), and to validate the results of genetic studies we also use specific software (Haploview, SNPator, FuncPred). For studies of the relationship with the genes ApoE, and given the discrepancies in previous studies, we carried out a meta-analysis to validate the findings. All found values were considered statistically significant if $p < 0.05$.

The population (general) studied was mostly male, with a ratio of 2:1, with a mean age, at the date of the study of 52. The OSA population was also predominantly male, but with a ratio of 6:1, with a mean age, at the date of the study, of 54.5 years with an average body mass index of 29.3.

Comparing the data of OSAS patients and patients with other sleep disorders (without respiratory distress) we found differences as regards of the presence of comorbidities clearly higher (75% vs. 61%) in patients with OSAS. Obesity was found in 56% of OSAS patients with comorbidities and in 84% of the patients with severe apnea index.

The analysis of the genetic polymorphisms for obesity, craneo-facial structure and soft tissue evidence that there are genes that, when present, are significantly associated with OSAS. These genes essentially the ones that encode for Obesity (SERPINE1 and LEPR) for Soft Tissue (CKM) for Craneo-Facial Structure (FGFR2 and TGFB1) and Other Genes Associated (PON1, LEPR and TGFB1).

On the relationship between HLA genes complex and OSA we demonstrated that there is significantly association with HLA-DRB1*03 and such association was independent of obesity. As regards to the relationship between HLA-A*02 allele and the OSA we found an association with the less severe forms of OSA (50% in mild apnea and 53% in moderate apnea) which may suggest that this allele may be a marker to a better prognosis for the most sever apneas.

From our study and from the comparison made by the developed meta-analysis we concluded that the genotypic frequencies of ApoE alleles in patients with OSAS, in patients with other sleep disorders and in the control population, have no statistically significant differences, with the genotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ being the most represented in all groups and the genotypes $\epsilon 2/\epsilon 4$ and the $\epsilon 4/\epsilon 4$ are absent in the group of patients with OSA or other sleep disorders.

From the studies we conducted is possible to concluded that: obesity and comorbidities integrated in the spectrum of metabolic abnormalities are often associated with OSA entities, regardless of the severity of the disease, being obesity a determining factor in the worsening of clinical symptoms; the HLA-DRB1*03 is a susceptibility factor for the occurrence of OSAS and that males and obesity as a risk factors for OSA; the HLA-A*02 allele is not a susceptibility factor for OSA probably being a protective factor for more severe OSA cases; some of the genetic polymorphisms for obesity, craneo-facial structure and soft tissue evidence that there are genes that, when present, are significantly associated with OSAS, and that there is no significant association between ApoE gene and the risk of OSA. These findings support the initial idea that OSAS is a complex clinical entity in wich individual factors and genetic determinants are involved in the pathophysiology of the clinical picture.



RESUMEN

El síndrome de la apnea obstructiva del sueño (SAOS) es una entidad clínica muy común y frecuente pero a pesar de los avances científicos en el diagnóstico y tratamiento, su etiología no es completamente conocida. En primer lugar, porque a pesar de su elevada prevalencia en la población general (4% en hombres y 2% en mujeres), SAOS con frecuencia asintomática. El reconocimiento clínico de SAOS es particularmente importante debido a que es una enfermedad con graves consecuencias en términos de morbilidad y puede ser un factor de descompensación de otras enfermedades. Asimismo puede conllevar, debido al trastorno del sueño que induce y la consecuente hipersomnia, un aumento de la mortalidad directa o indirectamente, ya que la hipersomnia se asocia con accidentes. Debido a lo anteriormente comentado, el SAOS representa un importante problema de salud pública.

La identificación de las características clínicas, morfológicas y genéticas predictivas de la aparición de esta condición puede contribuir a una mejora significativa en la definición de los grupos de riesgo para los que se podrán tomar las medidas preventivas.

La obesidad, en particular la cervical, y los cambios en la estructura craneofacial, muscular y ósea, han sido descritos como factores implicados en la etiología del SAOS. Varios estudios han intentado relacionar estos factores etiológicos (especialmente la obesidad y los cambios en las estructuras craneofaciales) con características genéticas individuales. Sin embargo, éstos no han demostrado resultados consistentes.

Con el propósito de poder contribuir a la interpretación de la fisiopatología de la SAOS investigamos las características genéticas y morfológicas de pacientes con SAOS que ayuden a la identificación de factores etiológicos; para así poder definir de una forma más eficaz poblaciones de riesgo y, por tanto, ayudar al posible diagnóstico y a la prevención / tratamiento de estos grupos de población.

En este trabajo se pretende caracterizar a una población con SAOS e identificar los factores individuales (como la obesidad y el riesgo de comorbilidades) y el papel de los factores genéticos (alelos HLA y APOE) y de los polimorfismos genéticos (genes relacionados con la obesidad, la estructura craneofacial, y los "tejidos blandos") en la susceptibilidad a SAOS.

Los objetivos señalados en el párrafo precedente permitirán comprender la fisiopatología de la SAOS, en base a saber si hay factores individuales genéticamente

determinados que están asociados al SAOS o que son más comunes en los pacientes con SAOS y si estos factores actúan de manera aislado o tienen que estar relacionados con el SAOS para que esta entidad se desarrolle.

La muestra de pacientes estudiados prospectiva y consecutivamente en una consulta de sueño de un Hospital Central fueron 324, que requerían de un registro poligráfico noturno por sospecha de que sufría un trastorno del sueño: SAOS, ronquido, narcolepsia, movimientos periódicos de las extremidades u otras enfermedades del sueño fueron identificadas de acuerdo a los criterios de clasificación de la *American Academy of Sleep Disorders* (ICSD 3). De éstos, 284 completaron todos los estudios, de los que 145 presentaron SAOS, aunque sólo 128 tuvieron un estudio completo de las variables asociadas al SAOS.

Todos los pacientes se registraron durante una noche de sueño con el estudio poligráfico vídeo incluyendo variables de la actividad cerebral, del movimiento, de la respiración y estudios de comportamiento de acuerdo con *standards*. Después del registro se tomaron muestras de sangre para estudios genéticos dirigidos a la identificación de los alelos HLA, al genotipado de los polimorfismos de nucleótido único y a la identificación de las isoformas de APOE.

Estudiamos la importancia de los factores individuales (sexo, índice de masa corporal) y comorbilidades en asociación con el SAOS y la gravedad del mismo, que ha sido identificado como leve, moderado o grave, según el índice de apnea-hipoapnea por hora.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS para Windows (Version 22, SPSS Inc.). Asimismo, para validar los resultados de los estudios genéticos también utilizamos un *software* específico (*Haploview*, *SNPator*, *FuncPred*). Para los estudios de la relación con los genes APOE, y dadas las discrepancias en los estudios anteriores, se realizó una meta-análisis para validar los hallazgos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si tenían un $p < 0,05$.

La muestra estuvo constituida fundamentalmente por hombres, en una proporción de 2:1, con una edad media de 52 años en el día del estudio. En relación a la submuestra con SAOS, nuevamente estuvo constituida predominantemente por hombres, en una proporción de 6:1, con una edad media de 54,5 años en el día del estudio, y con un índice medio de masa corporal de 29,3.

Comparando los datos de los pacientes con SAOS y pacientes con otros trastornos del sueño (sin dificultad respiratoria) la presencia de comorbilidades ha sido claramente superior

(75% vs. 61%) en pacientes con SAOS. La obesidad se encontró en el 56% de los pacientes con SAOS y con comorbilidades y en el 84% de los pacientes con índice de apnea severa.

El análisis de los polimorfismos genéticos de la obesidad, estructura craneofacial y tejidos blandos evidenció que hay genes que, cuando están presentes, se asocian significativamente con SAOS. Estos genes son esencialmente los de la codificación de la obesidad (SERPINE1 y LEPR), del tejido blando (CKM), de la estructura craneofacial (FGFR2 y TGFB1) y otros genes asociados (PON1, LEPR y TGFB1).

En relación con la asociación entre los genes del complejo HLA y el SAOS, se demostró la existencia de una asociación significativa con HLA-DRB1*03 que era independiente de la obesidad. En cuanto a la relación entre el alelo HLA-A*02 y el SAOS se encontró una asociación con formas menos graves de el SAOS (50% en la apnea leve y 53% en la apnea moderada) que puede sugerir que este alelo puede ser un marcador para el mejor pronóstico, en los pacientes con apnea más grave.

Nuestro estudio y la comparación hecha por el meta-análisis desarrollada concluyeron que las frecuencias genotípicas de alelos ApoE en pacientes con SAOS, en pacientes con otros trastornos del sueño y en la población control, no presentaban diferencias estadísticamente significativas, siendo el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ el más representado en todos los grupos y los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 4$ y los $\epsilon 4/\epsilon 4$ ausentes en el grupo de pacientes con SAOS y en el grupo de otros trastornos del sueño.

Los estudios realizados nos condujeron a las siguientes conclusiones que: i) la obesidad y las comorbilidades integradas en el espectro de anomalías metabólicas se asocian a menudo a SAOS, independientemente de la gravedad de la enfermedad, siendo la obesidad un factor determinante del empeoramiento de los síntomas clínicos; ii) el alelo HLA-DRB1*03 es un factor de susceptibilidad para la aparición de SAOS, actuando el sexo y la obesidad como factores de riesgo para SAOS; iii) el alelo HLA-A*02 no es un factor de susceptibilidad para el SAOS, y probablemente sea un factor protector para la SAOS más grave; iv) algunos de los polimorfismos genéticos para la obesidad, la estructura craneofacial y el tejido blando evidencian que hay genes que, cuando están presentes, están asociados significativamente con SAOS; v) no existe una asociación significativa entre los genes ApoE y el riesgo de SAOS. Estos datos apoyan la idea inicial de que el SAOS es una entidad clínica compleja y que hay factores individuales y determinantes genéticos implicados en la fisiopatología del cuadro clínico.





1. ***CAPÍTULO 1.***
INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

1.1. O SONO COMO PROCESSO FISIOLÓGICO FUNDAMENTAL PARA A HOMEOSTASIA

Definição de termos

Existem muitas definições do sono apresentadas por diferentes autores, de acordo com as suas áreas científicas, com diferentes perspetivas e abordagens, não sendo por isso possível afirmar que uma definição seja mais correta que outra. De facto, todas elas acabam por se complementar.

Sono (do latim *somnu*, com o mesmo significado) tem sido definido como um estado de consciência, complementar ao da vigília (ou estado desperto), em que há repouso normal e periódico, caracterizado pela suspensão temporária da atividade voluntária percetivo-sensorial e motora (Carskadon e Dement, 1994). “Sono é um estado intermédio entre a vigília e a morte; a vigília considerada como o estado ativo de todas as funções intelectuais e biológicas e a morte é a sua suspensão total” (MacNish R. in the Philosophy of Sleep. New York, D. Appleton and Company, 1834., citado por Dement WC, 1994).

Friedman, 1995 definiu o sono como sendo “o desencadear deliberado de uma alteração ou redução do estado consciente que dura, em média, 8 horas tendo início sensivelmente à mesma hora, em cada período de 24 horas, resultando, geralmente, em sensação de restabelecimento da energia física, psíquica e intelectual”. De acordo com Fontaine et al., 2002 o sono é importante para a recuperação da saúde em situação de doença, enquanto a privação deste pode afetar a regeneração celular assim como a total recuperação da função imunitária.

Perspetiva histórica

Os conceitos do sono como um processo cíclico foram apresentados num trabalho pioneiro por Dement e Kleitman (1957). Estes autores descreveram as variações cíclicas no electroencefalograma (EEG) durante o sono e relacionaram-nas com os movimentos oculares, a atividade motora geral e os sonhos. Foi assim definido, pela primeira vez, a existência de ciclos REM – acrónimo de “Rapid Eye Movements” ou Movimentos Oculares Rápidos - e ciclos não REM (NREM) no sono normal de humanos. A classificação e a caracterização do sono têm sofrido grandes alterações ao longo do tempo. Uma das contribuições mais significativas para a compreensão dos ciclos ou das fases do sono, foi o trabalho de Rechtschaffen e Kales, 1968. Estes autores alteraram as classificações do Sono propostas até então, introduzindo o conceito das fases de sono discretas: Acordado, Período de Sono REM e Período de Sono NREM (estádios 1, 2, 3 e 4). Esta classificação baseou-se nos registos de variáveis biológicas: o registo de ondas cerebrais no Electroencefalograma (EEG); os dados obtidos pelo registo dos movimentos oculares através da electro-oculografia – ou Electro-oculograma (EOG); e resultados da atividade muscular em estudos de Electromiografia (EMG) (ver figura 1). Assim, foi possível estabelecer que o estado de sono é caracterizado por um padrão de ondas cerebrais típico, essencialmente diferente do padrão do estado de vigília, bem como do verificado noutros estados de consciência. Dormir, nesta aceção, significa passar do estado de vigília para o estado de sono.

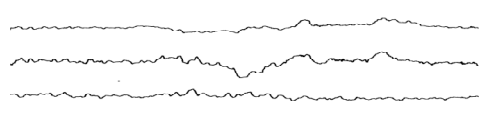
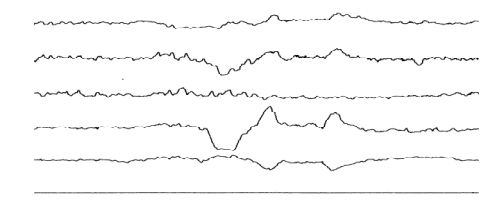
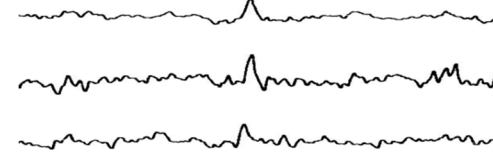
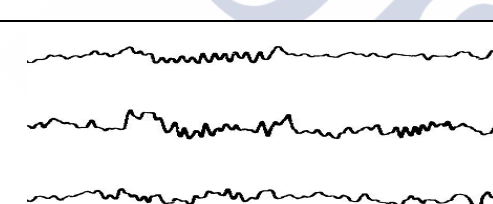
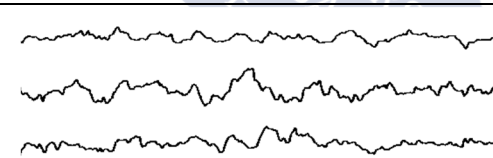
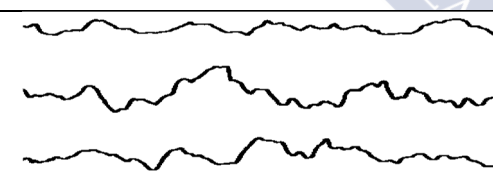
Estado	Esquema do Registo	Características do Registo
Acordado		Beta, alfa > 50% / movimentos dos olhos, tonicidade muscular máxima.
Sono REM		Teta e alfa. Movimentos oculares rápidos (Canal registo em 4º e 5º lugar) e Atonia muscular (exceto músculos oculares) registada no 6º canal (inferior).
Sono Não REM Estádio S1		Teta, alfa. Movimentos lentos dos olhos, tonicidade muscular reduzida.
Sono Não REM Estádio S2		Teta, complexos K. Fusos de sono. Escassos movimentos oculares. Tônus muscular baixo.
Sono Não REM Estádio S3		Teta, delta > 20% e < 50% sem movimento dos olhos, Fusos. Tônus muscular ainda mais reduzido.
Sono Não REM Estádio S4		Teta, delta > 50% sem movimentos oculares. Tônus muscular extremamente baixo.

Figura. 1 - As fases do sono e as suas características, adaptado de Rechtschaffen and Kales, 1968. Na coluna da direita descreve-se a atividade gráfica registada no EEG, EOG e EMG.

Depois desta excelente contribuição para a classificação dos ciclos e estádios de sono passou a ser corrente a nomenclatura indicada na coluna da esquerda da figura 1: acordado, Sono REM, Sono Não Rem e, neste, os estádios S1 a S4. Manteve-se esta designação até

2007. Desde então e após trabalho de consenso, publicado por Silber et al., o sono passou a ser caracterizado e os ciclos classificados em REM e Não REM e dentro deste ciclo os Estádios passaram a ser designados NREM 1, NREM2 e NREM3. O Estádio NREM 3 agrupa as características dos anteriores S3 e S4. Resultou esta classificação do consenso necessário para se resolver uma dificuldade que frequentemente se constatava, a de rápidas mudanças na duração do sono mais lento (com ondas delta) cujas percentagens se aproximavam ou mudavam de S3 para S4 ou vice-versa. Pelo que S3/S4 passaram a integrar um estágio único (Silber et al., 2007). Esta classificação é hoje em dia universalmente aceite e a utilidade da mesma veio a ser reforçada (e ratificada) na recente publicação da nova Classificação Internacional de Doenças do Sono (International Classification of Sleep Disorders – ICSD) da American Sleep Disorders Association (ASDA), publicada em 2014 (ICSD 3, 2014).

1.1.1. Caracterização dos Ciclos de Sono

Um ciclo do sono dura cerca de noventa minutos, ocorrendo quatro a cinco ciclos num período de sono noturno (Martins da Silva, 1986). O sono divide-se, então, em dois ciclos fisiologicamente distintos: Sono NREM e Sono REM (Figura 2). Esta sequência é fisiológica no padrão de sono do adulto, mas encontra-se bem estruturado também na criança.

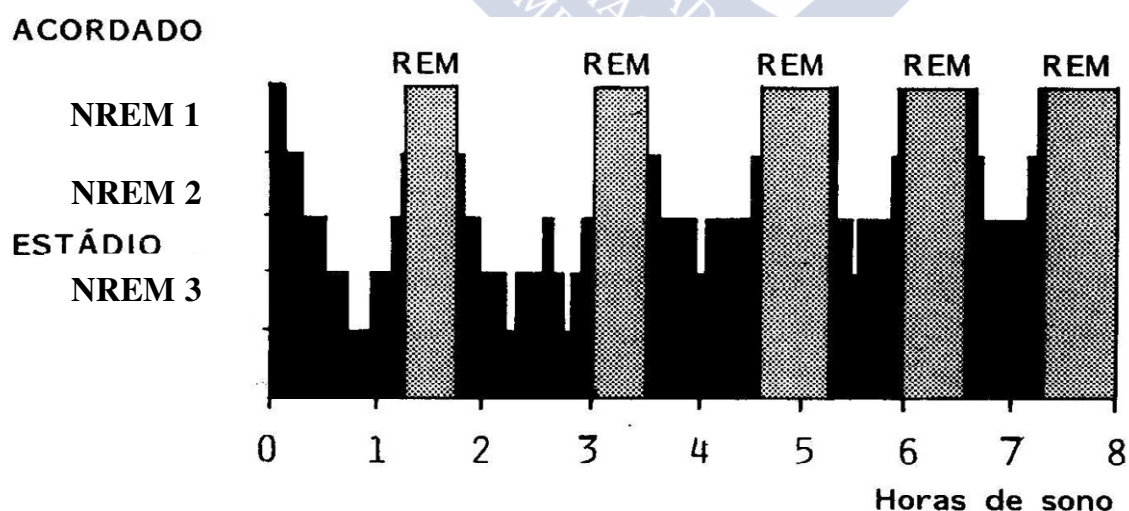


Figura. 2 - Hipnograma. Representação esquemática para uma noite de sono de 8H (Adaptado Martins da Silva, 1986). A designação de Sono REM-NREM segue a nova classificação.

A idade é o fator mais crucial para determinar como os humanos dormem. Os padrões EEG de sono normal e a arquitetura de sono em geral estão presentes, desde o primeiro ano de idade, mesmo em crianças com alterações neurológicas graves. E, há cada vez mais evidência que as alterações e as patologias do sono têm um papel determinante no desenvolvimento da criança e consequentemente do adulto saudável (Grigg-Damberger et al., 2007).

O número de ciclos por noite bem como a sua duração e regularidade, dependem da duração total do sono e também diferem ao longo da vida. No entanto, há alguma controvérsia sobre a duração e estabilidade dos ciclos. Num estudo efetuado por Weitzmann et al., em 1982, pormenorizam-se algumas diferenças dos padrões de sono, em ritmo livre, ou sob controlo temporal, quando são comparadas populações de adultos jovens com adultos mais idosos registados nas mesmas condições. Nesse estudo, esses autores estudaram 2 populações: 6 adultos jovens (com idades entre 23 e 30 anos) e 6 adultos com idades entre os 53 e os 70 anos, em condições (de ritmo) livres e em situações controladas (situação de treino temporal), ambas sem isolamento social, entre a 3^a e 8^a noites e determinaram as características dos ciclos e estádios de sono e a temperatura retal nesses indivíduos. Encontraram diferenças na duração do sono, com redução do período, e da amplitude da temperatura corporal no grupo de indivíduos mais velhos, quando em ritmo livre. O mesmo se passava em termos de eficiência, tempo total em sono (TTS), latência ao REM, duração dos episódios de REM, percentagem de REM nas últimas 2 horas de sono e o tempo entre o final do sono e o levantar, que dependiam do treino e da idade. O período do ciclo de sono-vigília, os despertares a partir do REM e a percentagem de REM nas 3 primeiras horas do sono, não se relacionaram com a idade mas com o treino. Os estádios de sono em percentagem do TTS divergiam em função da idade e eram independentes do treino. A latência ao sono, bem como a relação da duração do sono com tempo total de registo não dependiam do treino nem da idade. Além disso, verificaram-se várias mudanças de período e de fase dos ritmos sono-vigília e da temperatura, em vários indivíduos, no período livre (Weitzman et al., 1982).

Os estudos da variabilidade da duração e das características da ciclicidade do sono são diversos e as conclusões divergem. Haimov e Lavie, 1997 encontraram diferenças entre adultos jovens e idosos, com redução de percentagem de NREM e da eficiência do sono, considerando que há uma tendência, com a idade, de redução da amplitude e um avanço de fase do sono (Haimov e Lavie, 1997).

Mas o número de ciclos por noite, a duração dos mesmos e as variações com a idade, têm sido analisados em vários trabalhos havendo discrepâncias no que respeita a comparações já que os resultados dos estudos são conseguidos, frequentemente, com a utilização de metodologias que não medem os mesmos parâmetros. As metodologias usadas vão desde inquéritos, a diários de sono, estudos do movimento e repouso por actigrafia, registos poligráficos em meio hospitalar, e são dirigidos a diversas populações, e abrangendo quer os ciclos REM e NREM, quer a comparação da duração da vigília e sono, e mesmo ao estudo e variação dos intervalos entre sesta, e ainda aos momentos de propensão para o sono. Num estudo de grupos de indivíduos escalonados sequencialmente segundo as idades, desde recém-nascidos prematuros (grupo 1) a adultos idosos: 60-80 anos, num total de 58 indivíduos distribuídos por 7 grupos, Arnardóttir et al., 2010 encontraram um aumento da duração média do período de sono. Esse aumento é acentuado para o grupo dos prematuros e o grupo entre os 2 e os 6 anos de idade. Depois desta idade ocorrem apenas ligeiras mudanças, o que reforça conclusões de outros trabalhos que já apontavam para a consolidação do sono desde jovem (Arnardóttir et al., 2010).

Durante o sono, o indivíduo jovem passa, geralmente, por ciclos repetitivos, começando pelo estágio 1 do sono NREM, progredindo até ao estágio NR3, volta ao estágio NR2, e entra em sono REM, volta de novo ao estágio NR2 e assim repete-se novamente todo o ciclo. Só em situações excepcionais, em patologia do sono, como por exemplo na Narcolepsia, é que um adulto pode entrar diretamente, ou seja adormecer, em Sono REM.

No entanto, as sequências de ciclos ou de estádios poderão variar consideravelmente. Estudos de sono referidos por Webb e Dube, 1981 e realizados durante várias noites seguidas investigando diários de sono de estudantes universitários jovens, saudáveis, mostraram que há uma variação média da duração total de sono de 1 hora por noite. A variação da duração do sono foi maior quando se comparou entre a duração do sono em noites de dias da semana versus o sono de noites dos fins-de-semana, traduzindo grandes diferenças entre indivíduos e também para o mesmo indivíduo. Os mesmos autores referem ainda outro estudo em que os registos de sono de adolescentes e adultos jovens saudáveis durante 5 noites em condições controladas (de luminosidade, silêncio, horas de refeições e atividade diária) em que se constatou que havia uma enorme variabilidade no momento da ocorrência, duração e sequência dos ciclos de sono (Webb e Dube, 1981). Finalmente, para estudar a variabilidade da duração e sequência dos ciclos e estádios de sono, estes autores registaram durante 3 noites

o sono de um indivíduo saudável, em situação controlada – sempre na mesma hora de deitar, no mesmo quarto e nas mesmas circunstâncias ambientais - evidenciando que nessas três noites apenas a hora de ocorrência do primeiro ciclo REM é semelhante, variando de noite para noite a ciclicidade e a duração dos ciclos (Webb e Dube, 1981). Mas também o conhecimento que a duração dos ciclos é diversa durante a noite resultou da investigação deste grupo. Desses estudos conheceu-se que nos primeiros ciclos do sono, os períodos de sono NREM (mais concretamente o estágio 3 e 4) têm uma duração maior que o sono REM e a percentagem deste sono no cômputo geral do ciclo NREM/REM é menor. À medida que o sono vai progredindo, os estádios 3 e 4 começam a encurtar e o período de sono REM começa a aumentar. Na primeira parte do sono predomina o sono NREM, sendo os períodos de sono REM mais duradouros na segunda metade. Mas, como demonstraram Webb e Dube, no trabalho citado, a variabilidade inter e intra-individual é enorme.

A organização cíclica do sono (grande ciclo NREM-REM) é uma das suas características intrínsecas. O mesmo se passa com as características de alternância dentro do NREM. As modificações dos padrões de atividade cerebral são uma constante e, como atrás caracterizamos, servem de base à classificação dos diversos estádios. No entanto a caracterização do sono lento nem sempre é fácil e, por isso, a mais recente classificação do sono agrupa os estádios 3 e 4 em NREM 3 (Silber et al., 2007). Como atrás dissemos foram definidos no sono NREM os estádios NREM1, NREM2 e NREM3, em lugar da classificação antes descrita. Por razões de análise dos diversos estudos e comparações entre os mesmos utilizaremos indiscriminadamente as classificações NR 1-3 e NR 1-4, embora consideremos que a nova classificação é a que mais facilmente permite partilha de informação entre os diversos grupos.

Os padrões de alternância NREM-REM, podem apresentar pequenas variações de indivíduo para indivíduo do mesmo escalão etário. Como se pode observar na figura 2 os padrões de sono da criança, do adulto jovem e do idoso são diferentes. No adulto idoso os ciclos de sono são mais frequentemente interrompidos. Tal constatação não é, porém, sistemática e podem existir razões do ponto de vista biológico que determinem essa variabilidade, tais como maior prevalência de comorbilidades e disfunções que interferem particularmente no sono do idoso.

Um esquema simples, definidor da variabilidade do sono entre gerações, resulta da figura 3 e que é uma adaptação dos registos publicados por Penzel e Kesper, 2006.

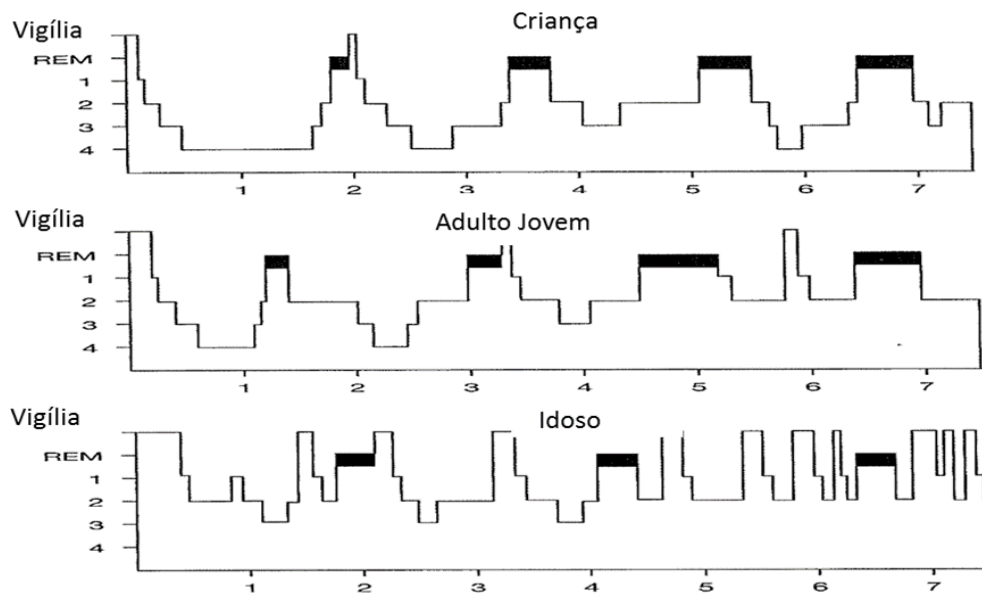


Figura 3. Esquema adaptado da figura publicada por Penzel e Kesper 2006 em que se mostram as diferenças na estrutura do sono normal: de uma criança (histograma de estádios de sono - ou hipnograma - na parte superior da figura); de um adulto jovem (no hipnograma na parte média da figura) e de um idoso (no hipnograma inferior da figura). As horas (duração sono desde o início) de ocorrência e duração dos diversos ciclos estão representadas nas abcissas - eixo do X (horizontal). Os estádios de sono em Sono NREM, Sono REM e vigília estão referidos em ordenadas - eixo do Y (vertical), respetivamente como 1, 2, 3, 4 e REM e vigília. Apesar de nesta figura parecer fácil distinguir o sono de três grupos etários bem distantes em idade, na realidade, como se explica no artigo citado e no texto desta Tese, as diferenças nem sempre são marcadas, como podem mesmo inverterem-se as características, em cada e entre os grupos etários.

1.1.1.1. O Sono REM

O sono REM caracteriza-se por uma intensa atividade elétrica cerebral registada no Eletroencefalograma (EEG) (Figura 4) semelhante à que ocorre em vigília mas acompanhada por hipotonia, e “paralisia funcional”, dos músculos esqueléticos, com exceção da musculatura ocular. Como nesta fase a atividade cerebral é semelhante à do estado de vigília, o sono REM é também denominado sono paradoxal. Nesta fase do sono, a atividade onírica (sonhos) é intensa, envolvendo frequentemente situações emocionalmente muito fortes. Há uma grande atividade da musculatura ocular, rápida e tónica. O registo dos movimentos oculares rápidos em situação de sono, caracteriza o Sono REM (ou Sono de Rapid Eye Movements). O ciclo REM representa 20 a 25% do tempo total de sono e surge em intervalos de sessenta a noventa minutos. É essencial para o bem-estar físico e psicológico do indivíduo. Tal como no estado de vigília, o sono REM tem uma maior ativação do sistema colinérgico e dos recetores da Acetilcolina (Ach). A acetilcolina é um neurotransmissor excitatório, necessário não apenas para comportamento cognitivo normal mas também para o controlo de

alerta e despertar estando dependente de atividade ou interação tálamo-cortical e também da interação tronco cerebral- córtex, modelando a atividade deste e promovendo a vigília ou o Sono REM, levando à dessincronização e à modulação de ritmos cerebrais (Platt e Riedel, 2011).

Diferente é também o papel do Sono na aprendizagem e memória. Embora o sono, em geral, tenha um papel fundamental na aprendizagem, especificamente o Sono REM tem também um papel fundamental na consolidação da memória. Num trabalho recente de Perogamvros et al, 2013 faz-se uma revisão do papel do sono e do sonho na memória. Estes autores consideram que o aumento da atividade na amígdala e nas regiões dopaminérgicas mesolímbicas durante o Sono REM promove a consolidação de traços mnésicos em que haja grande componente emocional e motivacional. Do mesmo modo as trocas de informação, coordenadas, entre hipocampo e o estriado durante o sono NREM contribuem para reforço mnésico seletivo. Disso resulta que a desregulação destes processos emocionais e motivacionais por alterações do sono (por exemplo por insónia ou privação do sono) possa levar ao aparecimento de patologias relacionadas com a dificuldade em recordar factos ou situações individuais diversas e, por isso, poderem ocorrer alterações de comportamento de diversos tipos.

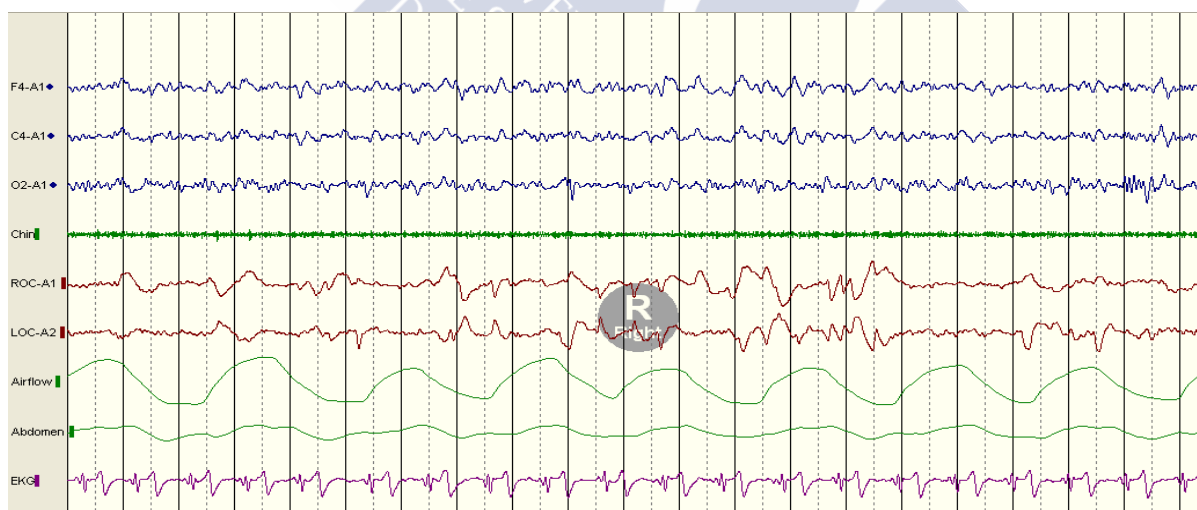


Figura 4 - Trecho de sono REM - De cima para baixo: 3 Canais de Sinal Elétrico Cerebral - Eletroencefalograma ou EEG; 1 canal de registo da atividade muscular (EMG) submentoniana (Chin), no queixo, que é inexistente em S-REM; 2 canais de oculografia para olho esquerdo e direito (EOG-L e -R), revelando movimentos oculares amplos (círculo assinalado com R); “Airflow” Canal de registo de fluxo aéreo - naso-bucal; “Abdómen” - Canal de registo de movimentos respiratórios tóraco-abdominais. EKG - Canal de registo de electrocardiograma. Figura adaptada de registo poligráfico de sono efetuado no Serviço de Neurofisiologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto.

1.1.1.2. O Sono NREM

O sono NREM ocupa cerca de 75% do tempo do sono. Entre a sua descrição pela Escola de Stanford nos anos 50 do Século XX e o ano de 2007 sempre foi considerado como sendo constituído por quatro períodos distintos conhecidos como estádios 1, 2, 3 e 4. Esta classificação resultou dos trabalhos que definiram o sono como um processo cíclico e também da interpretação geral dada pela escola americana que culminou com a publicação por Rechtschaffen e Kales do Manual para Classificação do Sono (Rechtschaffen and Kales, 1968). Embora esta categorização se mantenha, atualmente usa-se uma nova classificação do sono Não REM em que se agrupam os estádios do NREM 3 e 4. Ou seja, depois dos trabalhos da “Visual Task Force Members” e a publicação do trabalho “The visual Scoring Sleep in Adults” a classificação de Sono faz-se entre “Stage W – Vigília”; “Não REM” (atualmente referida como NR1, NR2 e NR3) e “Stage REM” (Silber et al., 2007), para adultos e com a sua correspondente reavaliação para crianças (Grigg-Damberger et al., 2007).

Estádio 1 (atualmente NR1):

Começa com a sonolência. A duração é breve e variável. A pessoa adormece. É caracterizado por um EEG com trechos semelhantes ao do estado de vigília oscilando com outros em que há atividade elétrica mais irregular, por vezes lenta (teta) e em que aparecem algumas ondas síncronas consideradas “transitórios de sono”. Neste estágio o indivíduo é facilmente despertável. A reentrada em sono faz-se facilmente. Predominam sensações de vagoio, pensamentos incertos, mioclonias (movimentos bruscos e involuntários) das mãos e dos pés e ainda lenta contração e dilatação pupilar. Nessa fase, a atividade onírica está sempre relacionada com acontecimentos vividos recentemente. No EEG aparecem as primeiras ondas transitórias (ondas do vértex – ver seta indicativa na figura 5 descritiva do estágio 2) que indicam a transição esperada para o estágio 2 e refletem a intervenção de estruturas cerebrais dos núcleos da base. Este estágio está esquematicamente representado na parte superior da figura 5 (Figura 5-A).

Estádio 2 (atualmente NR2)

O indivíduo em sono Estádio 2 já estar a dormir, porém não profundamente. Tem duração variável, no início pode ser de cerca de cinco a quinze minutos, depois, durante os outros ciclos, pode variar mais. O EEG mostra frequentemente ondas mais lentas, aparecendo

os complexos K (identificado por um retângulo vertical na figura 5B). Nessa fase, os despertares por estimulação tátil, fala ou movimentos corporais são mais difíceis do que no anterior estágio. No Estádio 2 a atividade onírica já pode surgir sob a forma de sonho com uma história integrada. Este estágio é identificado pelo aparecimento no EEG de atividade cerebral síncrona, com frequência geralmente entre 12 e 14Hz (ou ciclos por segundo) que, no adulto, é mais ampla e ocorre mais frequentemente nas regiões cerebrais paracentrais e anteriores, tendo origem no tálamo, transmitindo-se ao córtex da superfície (Steriade, 2006). Essa atividade é denominada de Fusos de Sono, identificado por um círculo na Figura 5B. Os fusos de sono aparecem a partir dos 3-6 meses de idade sendo então mais evidentes nas regiões laterais e, com a maturação cerebral, evoluem ou são mais evidentes nas regiões paracentrais e anteriores. Esta atividade síncrona e oscilatória tem origem em estruturas cerebrais bem identificadas e um papel muito importante na geração de atividade cerebral em vigília e em sono, bem como na estimulação das estruturas corticais (Steriade, 2006). Os ritmos cerebrais têm um papel determinante na plasticidade das sinapses e consequente ativação das estruturas corticais. As grandes oscilações síncronas, tálamo-corticais, podem inclusive em sono NREM ajudar a consolidar traços mnésicos adquiridos em vigília. Também em sono lento (NREM) as grandes oscilações síncronas podem levar a descargas anormais traduzindo-se em crises epiléticas geradas a nível cortical ocasionando inibição de neurónios tálamo-corticais (pela ativação que provocam de neurónios tálamo-reticulares), o que explicará a não resposta a estímulos externos e à inconsciência que ocorre durante algumas das crises de epilepsia. O estágio NREM2 está esquematicamente representado na parte inferior da Figura 5 (Figura 5-B).



Figura 5-A

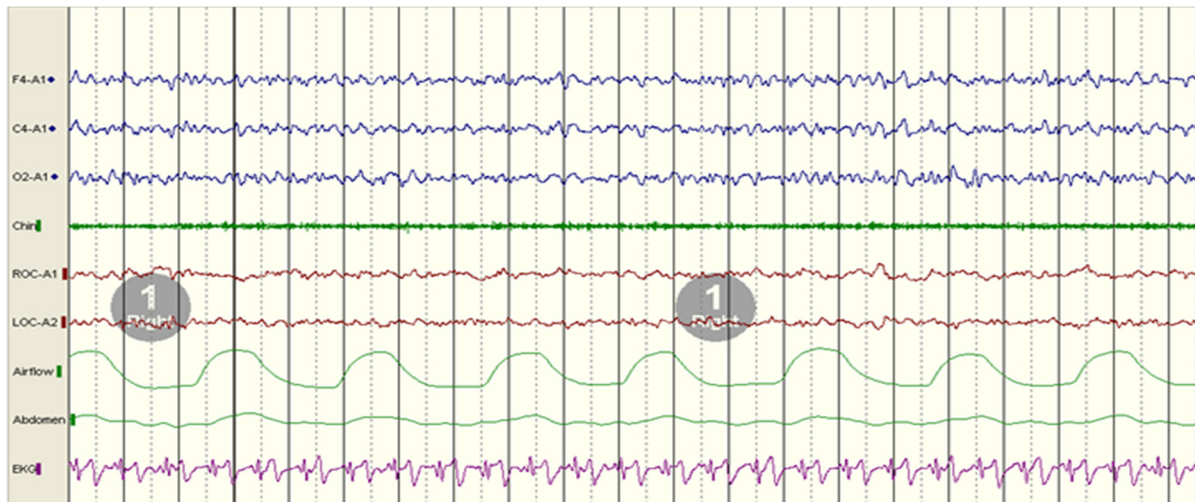


Figura 5-B

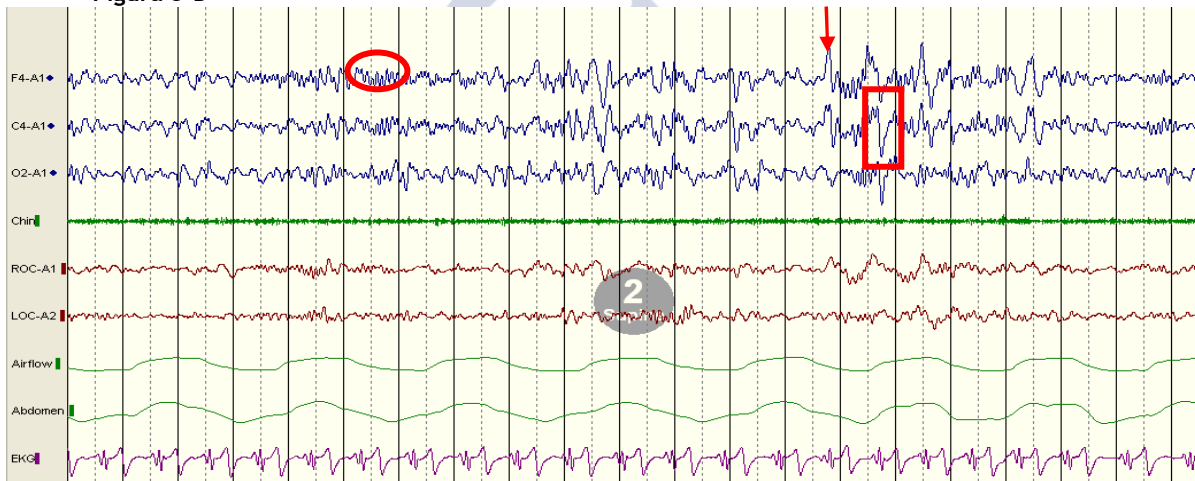


Figura 5 - Registo de EEG em Sono Lento ou Não-REM, Estádios I (Figura 5-A) e II (Figura 5-B). Transitórios de sono. A seta indica Ondas do Vértex (que também podem ocorrer em estágio I). Na parte inferior (Figura 5-B) registou-se Estádio 2 ou NREM, os círculos indicam Fusos de Sono, o retângulo o complexo K. Figura adaptada de registo efetuado no Serviço de Neurofisiologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto. Os diferentes canais registam na mesma sequência do enunciado na Figura 4.

Estádio 3 e Estádio 4 (atualmente NR3)

O Estádio 3 tem muitas semelhanças com o estágio 4 (e daí que na nova classificação estádios 3 e 4 estejam reunidos no estágio NR3-4 ou NR3). Nestes estádios os estímulos necessários para acordar são maiores. Do estágio 3 para o estágio 4, há uma progressão da dificuldade de despertar. Este estágio tem a duração de cerca de quinze a vinte minutos. De acordo com a classificação anterior, o estágio 3 caracterizava-se por ocorrer atividade cerebral lenta (delta) em 30 a 50% do tempo de registo em análise e pela persistência dos fusos de

sono. Este estágio está representado na parte média da figura 6, podendo-se observar que existe partilha de atividade elétrica cerebral com o considerado Estádio 4 – ou estágio de sono profundo. Por isso estão ambos os estádios representados na nova classificação como sendo NREM 3. É muito difícil acordar alguém nesta fase do sono. Traduz-se no registo EEG pela persistência de ondas lentas delta em 50% ou mais do trecho de registo em análise. É o período de sono lento e profundo em que se faz um grande restauro físico e daí a dificuldade em despertar a pessoa. Após este estágio os indivíduos podem transitar para outro estágio de Sono NREM, passar para Sono REM ou podem despertar. O estágio NREM 3 está esquematicamente representado na parte média da figura 6.

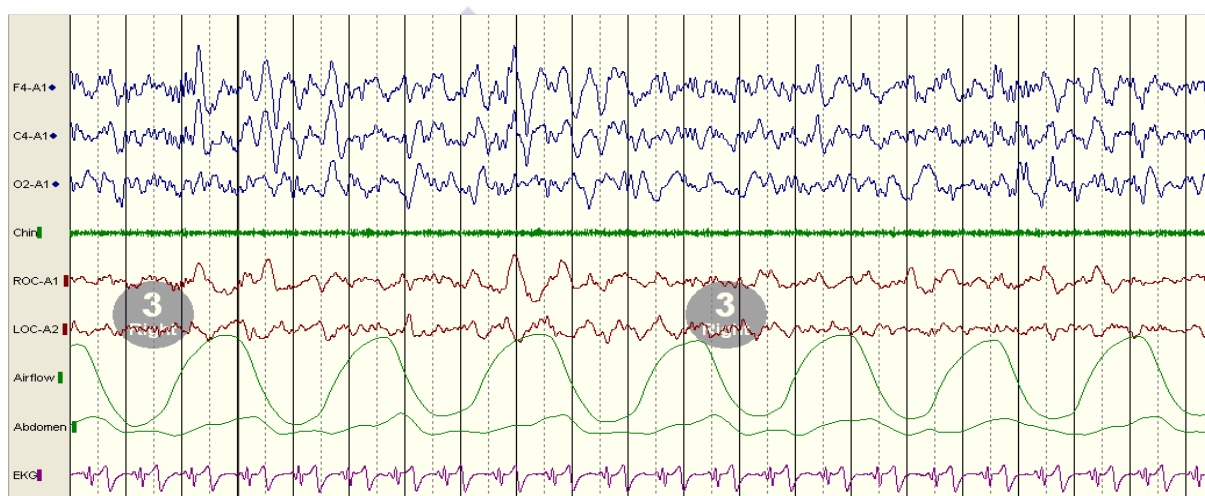


Figura 6 - Registo de EEG em Sono Lento. Estádios considerados III/IV, atualmente reunidos em NREM3. Sublinhados diversos aspetos de Atividade Lenta Delta característica do Sono Lento Profundo. Figura adaptada de Registo Efetuado no Serviço de Neurofisiologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto. Os diferentes canais registam na mesma sequência do enunciado na Figura 4.

Embora este padrão de ciclicidade seja esperado e comum durante o sono, esta ciclicidade não é estável. De facto, e como atrás referimos, os estudos de Webb e Dube, 1981, ao registarem sonos em noites sucessivas em jovens saudáveis, permitiram verificar a existência de uma grande variabilidade desse padrão.

Este estágio NREM, e nomeadamente no primeiro ciclo do sono, caracteriza-se pela secreção de hormona de crescimento em grandes quantidades, promovendo a síntese proteica, o crescimento e reparação tecidular, inibindo, assim, o catabolismo (Spiegel et al, 1999, Van Cauter et al., 2000). O sono NR3 tem, pois, um papel anabólico, sendo essencialmente um período de conservação e recuperação de energia física.

1.1.2. Relógio Biológico Circadiano em Humanos

Desde o aparecimento da Cronobiologia, nos anos 50 e 60 do século passado, foram investigados intensamente os ritmos biológicos. Embora vários autores tenham referido ainda no Século XIX processos biológicos cíclicos, a introdução do termo circadiano deve-se a Franz Halberg (Halberg et al., 1959). Pelo mesmo grupo foi publicada uma proposta de organização de termos num glossário que se revelou importante para o estudo dos processos cíclicos (Halberg et al., 1973). Nos anos 80 surgiram já publicações de síntese que dão uma visão alargada dos estudos realizados (Aschoff, 1981), pelo que se pode dizer que os ritmos circadianos (ritmos que ocorrem com uma frequência de um ciclo por cada dia, ou seja ritmos *circadiários*) estão muito bem estudados.

Todos os parâmetros fisiológicos medidos em eucariotas apresentam uma oscilação circadiana, o que não significa que todos estes parâmetros oscilem em uníssono, quer dizer, em fase. O fenómeno geofísico primordial, que atua como sincronizador dos ritmos circadianos, tanto em animais diurnos como noturnos, é a luz solar. Outros fenómenos ambientais podem atuar como sincronizadores para determinadas espécies, mas nunca com a mesma eficácia da alternância luz solar/escuridão (noite). Exemplos disso são a temperatura do ambiente, o ruído ambiental, as horas das refeições e as interações sociais. Mesmo assim, estes sincronizadores externos não conseguem alterar significativamente ritmos biológicos individuais tais como a temperatura corporal ou a curva de secreção do cortisol. Prova disso é o registo destes parâmetros em indivíduos (humanos ou outros da escala animal) quando vivem em sociedade (ou ambiente de sincronizadores sociais) ou excluindo esses mesmos sincronizadores (casos de estudos de luminosidade controlada ou em caves isoladas) e em que os momentos mais altos (*Acrofase*) ou mais baixos das curvas dos ritmos biológicos se mantêm estabilizados para as horas do dia (Aschoff J, 1981).

O tempo de sono é controlado pelo relógio circadiano, ou seja, um sistema de equilíbrio fisiológico ou homeostase sono-vigília e, nos seres humanos, dentro de certos limites, pelo comportamento. O relógio circadiano funciona em conjunto com a adenosina, um neurotransmissor que inibe muitos dos processos corporais associados à vigília. A adenosina é sintetizada ao longo do dia, os seus níveis elevados levam à sonolência. Nos animais diurnos, a sonolência ocorre quando o elemento circadiano origina a libertação da hormona melatonina e provoca uma diminuição gradual da temperatura corporal. É o ritmo

circadiano que determina a altura ideal para que ocorra um episódio de sono que seja corretamente estruturado e reparador (Wyatt et al., 1999).

A propensão homeostática para o sono (ou seja, a necessidade de sono em função da quantidade de tempo decorrido desde o último episódio de sono adequado) deve ser equilibrada com o elemento circadiano de sono satisfatório (Zisapel, 2007). Segundo este autor existe uma inter-relação estreita e robusta entre o ciclo sono-vigília, melatonina, temperatura corporal, pressão sanguínea, ritmos hormonais e imunitários que levam ao equilíbrio ou homeostasia. Com a idade essa robustez pode diminuir o que pode estar na origem de aparecimento de doenças do sono (Zisapel, 2007).

O relógio biológico afeta o ritmo diário de muitos processos fisiológicos. No esquema da figura seguinte (Figura 7) esquematizam-se, em termos de ciclo biológico de 24 horas (ritmo circadiano) os padrões circadianos típicos de um indivíduo sincronizado por eventos sociais (familiares ou laborais): levantar às 6:00 da manhã, atividade diária e dormir à noite (cerca das 22:00). Esta representação esquemática tem em conta não só a atividade laboral mas também a estrutura biológica humana geral, com padrões típicos de excreção máxima de cortisol (C) antes do (ou ao) despertar, de melatonina (M) (no início do sono), de hormona do crescimento (GH) do primeiro ciclo de sono; máximo (MxT) e mínimo (MinT) de temperatura corporal. Todavia nem todos os indivíduos partilham as regras esquematicamente representadas nesta figura. É conhecido, desde os anos 80 do século passado, que existem indivíduos para os quais a curva de atividade e das capacidades intelectuais e físicas é diferente. Considerando-se indivíduos de tipo vespertino por contraposição aos indivíduos mais comuns, tipo matutino. Embora tudo isso se tenha comprovado por registos biológicos (Kerkhof, 1981) que incluíram análises de metabolitos ou mesmo a registos de atividade elétrica cerebral, por potenciais evocados e electroencefalogramas (Vilhena et al., 2005) e a definição de “morning type - tipo matutino” e “evening type – tipo vespertino” esteja assente, há um dado que permanece imutável: uns ou outros dos indivíduos assim classificados (matutinos ou vespertinos) têm o seu ritmo biológico de atividade e metabolismo perfeitamente estabilizado. Ou seja, sempre de tipo matutino ou sempre tipo vespertino. As modificações do tipo matutino para vespertino, que podem ser determinadas por exemplo por mudanças de turnos de trabalho, podem acarretar alterações biológicas importantes levando mesmo ao aparecimento de perturbações de outros ritmos biológicos e mesmo alterações ou

doenças do sono, que se enquadram na classificação de doenças de sono por alterações de ritmo de trabalho (Silber et al, 2007).

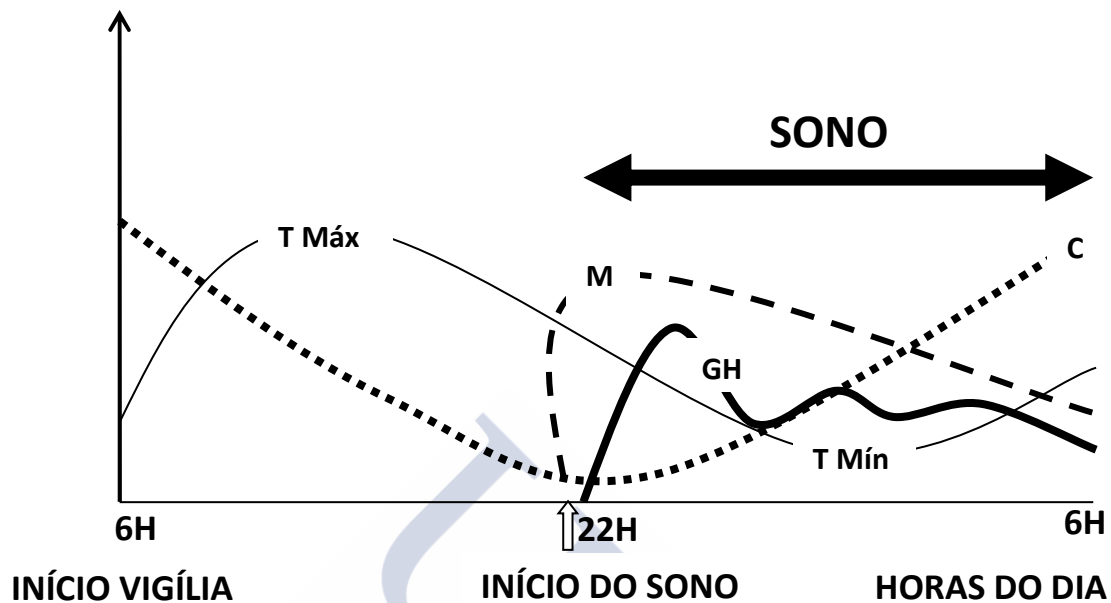


Figura7: Ritmo circadiano normal de humanos. Ao longo das 24horas (duração do ritmo) ocorrem períodos de vigília e sono. Na representação esquemática, referem-se ritmos biológicos bem conhecidos com padrões típicos das curvas de evolução da excreção máxima de Cortisol (C - linha a ponteados) antes do (ou ao) despertar; de Melatonina (M - linha a tracejado) (no início do sono), de Hormona do Crescimento (GH- linha a cheio grosso) do primeiro ciclo de sono; bem como do máximo (T Máx) e mínimo (T Mín) de temperatura corporal (linha a cheio fino). Como é referido no texto, nem todos os indivíduos partilham as regras esquematicamente representadas nesta figura sendo alguns mais do tipo vespertino e outros do tipo matutino.

1.1.3. Regulação de Variáveis Fisiológicas durante o Sono

1.1.3.1. Respiração

Parte integrante da respiração, a ventilação pulmonar durante a vigília (em situações de normalidade) é controlada pelas necessidades do metabolismo – resposta à maior ou menor procura de O₂ arterial para as necessidades tecidulares e excreção de CO₂, sendo relevante o papel de estruturas mais periféricas e de quimiorrecetores centrais neste equilíbrio. As mudanças respiratórias que ocorrem durante o sono ligeiro ou no sono profundo são o reflexo de necessidades metabólicas – homeostáticas diferentes das da vigília (embora, e só para exemplificar, em Sono REM e dado o carácter de maior atividade intelectual neste - essas necessidades podem ser semelhantes às da vigília). Também no sono ligeiro e no sono

profundo as necessidades e os controlos são diferentes sendo que neste último há um autocontrolo, não homeostático da ventilação, não dependente do controlo metabólico. A frequência respiratória no sono mais profundo é mais irregular, o relaxamento muscular é muito grande, sendo ambos (a irregularidade e a hipotonia) extremos em Sono REM, podendo ocorrer episódios de hipoventilação. Por tudo isso, o risco de se encontrarem patologias respiratórias, ventilatórias, é maior nestes estádios. O mecanismo é central, neuronal, e associa a hipotonia muscular, que tem um efeito duplo: por um lado, reduz a força de expansão torácica e, por outro, aumenta a resistência das vias aéreas superiores ao fluxo de ar. O diafragma mantém uma atividade irregular.

A dualidade da origem das mudanças respiratórias observadas (atuando sobre recetores centrais ou agindo sobre estruturas ventilatórias torácicas) obriga-nos a controlar, através do registo do fluxo aéreo nasal e/ou bucal e dos movimentos toraco-diafragmáticos, as possíveis alterações da respiração que ocorram em sono. Se num registo poligráfico noturno identificarmos a frequência e amplitude do registo de fluxo aéreo naso/bucal e os movimentos respiratórios, e combinarmos com o registo da saturação de Oxigénio e eventualmente com o estudo da saturação de CO₂, podemos falar de ventilação e respiração normal ou anormal. Assim, podemos classificar as paragens de ventilação em sono como Apneias. A classificação ou tipo de apneia depende da ocorrência simultânea ou não da cessação da ventilação/fluxo aéreo naso-bucal e dos movimentos toraco-diafragmáticos. Assim classificam-se as apneias em centrais – se houver cessação de ambos os registos – fluxo aéreo naso/bucal e movimentos toraco-diafragmáticos; apneias obstrutivas se os movimentos respiratórios toraco-diafragmáticos persistirem e o fluxo aéreo naso/bucal for nulo; e apneias mistas se ambas as situações ocorrerem, isto é haver cessação dos movimentos respiratórios e do fluxo aéreo e também recuperação dos movimentos tóraco-abdominais mantendo-se a cessação da entrada de ar pelo fluxo aéreo naso-bucal durante o sono.

1.1.3.2. Frequência Cardíaca

A frequência cardíaca reduz-se no sono lento, particularmente no sono NREM3. No sono profundo torna-se variável. O débito cardíaco reduz-se moderadamente tanto no sono lento como no sono profundo, e o mesmo se passa com a tensão arterial. Tendo em conta que se pode produzir uma diminuição da tensão arterial em 10% e uma diminuição da frequência

cardíaca em 6% sem alterações do débito cardíaco, a hipotensão durante o sono poderá depender de uma vasodilatação generalizada.

1.1.3.3. Pressão Arterial

A pressão arterial reflete a resistência vascular e o tónus simpático. Assim, a pressão arterial segue a atividade do sistema nervoso simpático e do parassimpático (autónomo) (Somers et al., 1993). Durante o sono REM a pressão sistólica aumenta quando comparada com a do sono NREM. Em pacientes com hipertensão ou alterações respiratórias em sono, a pressão arterial pode atingir valores extremamente elevados que são a consequência da vasoconstrição periférica e da ativação simpática. Isso pode ter consequências trágicas, nomeadamente nos casos de síndrome de apneia obstrutiva do sono.

1.1.3.4. Temperatura

Durante a vigília há uma constante interação entre os mecanismos de controlo cortical e hipotalâmico da temperatura corporal. Ao iniciar o sono lento há uma inativação do controlo cortical e libertam-se por isso os mecanismos automáticos. Durante o sono profundo, as mudanças fisiológicas mudam completamente e todas as formas de regulação da temperatura ficam suspensas. Dada a diminuição do tónus muscular e falta de tremor, não há possibilidade de produção de calor. A temperatura do corpo cai durante a noite e níveis mais baixos são atingidos de madrugada, nas últimas horas de sono. Os trabalhos de Guilleminault et al., 1975, de Parmeggiani et al., 1984, Zamboni et al., 1999 e de Parmeggiani 1995, demonstraram que a correlação entre a temperatura corporal e a do ambiente é variável e depende do momento do ciclo de sono-vigília em que se analisa.

1.1.3.5. Funções Endócrinas

Todas as hormonas do organismo apresentam ciclos de secreção. Estes ciclos são modulados por ritmos circadianos de luz-escurecimento, vulgo dia-noite, ou pelo ciclo vigília-sono, pela atividade autonómica, etc., tudo funções que convergem na estrutura do hipotálamo. O eixo hipotálamo-hipofisário é responsável por efetuar a ligação entre os processos neuronais em sono e a expressão hormonal. São várias as hormonas que são secretadas segundo o ciclo de sono e vigília. Este centro de integração e processamento,

responsável por regular várias funções como a ingestão de alimentos, as emoções, os instintos e a sexualidade é coordenado a nível superior e organiza as funções endócrinas.

O modo como o ciclo de sono vigília tem influência sobre o sistema endócrino pode-se esquematizar em:

- Hormonas modeladas por uma fase particular do sono, como a hormona do crescimento (GH), relacionada com uma fase de sono lento e, nomeadamente, no primeiro ciclo de sono. A Hormona do Crescimento tem o seu pico máximo de excreção no início do sono (primeiro ciclo de sono) e pulsos menores durante a noite.
- Hormonas fortemente influenciadas pelo sono como um todo, como a prolactina e a tirotrofina ou hormona tireo-estimulante (TSH), que aumentam em pulsos em Sono (Behrends et al, 1998).
- Hormonas influenciadas pelo sono, como a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), cortisol e melatonina mas com ritmos circadianos bem marcados. O ACTH e o Cortisol têm pico máximo de excreção de madrugada antes do despertar. A melatonina influencia o início do sono.

A manipulação das escalas de sono por atividades físicas, intelectuais, laborais, em extremo com a mudança da atividade individual para o período noturno (como é o caso de mudanças de turno de trabalho) pode levar a uma alteração drástica do padrão de secreção e da “utilidade metabólica destas hormonas” determinando o aparecimento de doenças do sono (Kim et al., 2015 e Schmid et al., 2015).

É clássica a influência que as mudanças na atividade diária, como o trabalho por turnos durante a noite, podem ter no padrão de secreção de hormonas como, por exemplo, na secreção de GH (ou Hormona do Crescimento). No caso de trabalhadores que têm turnos laborais noturnos o máximo de secreção de GH deixa de ter um valor máximo (ou “pico” máximo) no início do sono passando, quando o trabalhador dorme durante o dia, a secreção de GH a ter pequenos “pulsos” secretórios ao longo desse período de sono.

Num estudo recentemente publicado (Simola et al, 2014), os autores analisaram o papel do sono na criança, logo na pequena infância, e a importância do mesmo (escalas de sono e duração do sono equilibradas) no desenvolvimento físico e intelectual da criança e, por isso, na modelação do desenvolvimento normal. Cada vez mais aparecem trabalhos confirmando o papel do sono na homeostasia e o seu desequilíbrio como fator preponderante no aparecimento de doenças. As patologias do sono, cujas primeiras tentativas de

classificação datam dos anos 70 do século passado, agrupam hoje múltiplas entidades que têm motivado investigações diversas, quer das causas quer dos tratamentos das alterações do sono, e que se revelam fatores de incremento dos custos da saúde nos diversos países.

1.2. PATOLOGIAS DO SONO

Há mais de 40 anos que as patologias relacionadas com o sono têm suscitado um enorme interesse na comunidade científica. Uma primeira classificação provisória para os distúrbios do sono foi proposta na reunião anual da Associação de Estudos Psicofisiológicos do Sono (APSS), dos Estados Unidos, em 1972. Só em 1979 foi publicada, na revista *Sleep* então criada, uma exaustiva e completa classificação dos distúrbios do sono (ASDC, 1979). No entanto, essa classificação só foi plenamente aceite e introduzida na comunidade científica em 1990, quando foi elaborada a Classificação Internacional de Distúrbios do Sono (ICSD) (ASDA, 1990). Passou então a existir uma uniformização de critérios, que se traduziu na aquisição de uma ferramenta de enorme utilidade para a prática clínica e para a investigação em medicina de distúrbios do sono. No período compreendido entre 1990 e 1997 assistiu-se a profundas mudanças científicas e socioculturais que se refletiram no conhecimento e no interesse da medicina dos distúrbios do sono. Entre essas mudanças destacam-se: a difusão das necessidades de cuidados de saúde; a reforma dos cuidados de saúde pública, os esforços para uma melhor integração da medicina dos distúrbios do sono na comunidade das especialidades médicas; os grandes esforços para melhorar a sensibilização da população em geral para o elevado número de graves distúrbios do sono e, provavelmente o mais importante, um crescimento rápido da compreensão da fisiopatologia e tratamento eficaz dos distúrbios do sono. Todas estas mudanças e evoluções provocaram modificações drásticas na área da saúde, com consequências nas classificações de doenças e distúrbios do sono, incluindo a ICSD. Assim, e segundo a última classificação apresentada pela American Academy of Sleep Medicine (ICSD3, 2014) as patologias do sono estão classificadas em grandes grupos: Insónias, Doenças do Sono Relacionadas com a Respiração, Hipersónias de Origem Central, Doenças do Ciclo Circadiano Sono-Vigília, Parassónias, Doenças do Movimento Relacionadas com o Sono, Outras Doenças do Sono e Doenças do Sono relacionadas com doenças médicas e neurológicas (ICSD3, 2014).

1.3. ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM SONO

1.3.1. Evolução do Conhecimento das Alterações Respiratórias em Sono

Entre as patologias do sono mais frequentes e mais frequentemente estudadas encontram-se os distúrbios respiratórios em sono, com o seu expoente máximo (pela frequência com que se apresenta, pela gravidade da mesma ou à que pode estar associada, bem como pelas consequências físicas individuais – sobre a saúde ou sobre a actividade - e mesmo pelas consequências sociais que pode provocar) na Síndrome de Apneia Obstrutiva em Sono ou SAOS. Para se entender a importância do quadro clínico da SAOS, convém conhecer um pouco a história do estudo das alterações respiratórias em sono antes da descrição e análise desse quadro clínico. A primeira descrição de uma apneia obstrutiva do sono é geralmente atribuída ao escritor Charles Dickens que descreveu “Joe”, nos famosos *“The Posthumous Papers of the Pickwick Club”*, como um jovem com excesso de sono, obeso, ressonador, que levou à identificação de “young dropsy” ou “jovem com hidropisia”. A descrição foi objeto de análises por diversos investigadores das patologias do sono começando pela análise ser feita sobre as possíveis causas da sonolência. Como é referido por Dement, 1994, os estudos iniciais, mas realizados em vigília, levaram à conclusão que a hipercapnia era o fator determinante dessa sonolência. Mas após as descrições de Jung e Kulo, 1965, com estudos noturnos de sono de quadros idênticos, e já com possibilidade de análise comparativa da respiração noturna, percebeu-se o papel das apneias na desestruturação do sono e consequente hipersónia diurna, como descrevem no capítulo sobre síndromes de apneia obstrutiva Bao e Guilleminault, 2005. Estes autores reportam para Broadbent as primeiras descrições em 1877 da sintomatologia clínica que atualmente se enquadra na SAOS e para Wells em 1898 a cura da sonolência dos doentes por desobstrução das vias aéreas (Bao e Guilleminault, 2005). Tem-se mantido alguma polémica sobre quem descreveu em primeiro lugar as alterações clínicas, bem como o modo como se deu o enfoque mais correto à descrição por Dickens do quadro que apresentaria o jovem “Joe” (para alguns considerado como sendo portador de um quadro clínico intitulado “Síndrome de Prader Willi” – hipotonia, obesidade, alterações genéticas no cromossoma 15 - como referido por Bao e Guilleminault, 2005). Em trabalhos recentes mantêm-se diversas considerações sobre esta temática, muito interessantes e que podem, por exemplo, rever-se no trabalho de Lavie, 2008.

Do ponto de vista de conhecimento fisiopatológico o Síndrome de Ondine, ou CCHS (Congenital Central Hypoventilation Syndrome), foi dos primeiros a ser conhecido. É uma alteração do sistema nervoso central em que há uma deficiência no controlo autónomo da respiração, causando como principal sintoma a apneia durante o sono. Dependendo da gravidade do síndrome, a dependência do suporte ventilatório pode atingir as 24 horas por dia, ou seja, nem mesmo quando o indivíduo está acordado consegue manter uma respiração satisfatória. A comunidade médica e investigadores da França, Alemanha e Itália utilizam o termo Síndrome de Ondine, enquanto que no caso dos EUA utilizam o termo CCHS que em português significa Síndrome da Hipoventilação Central Congénita.

As denominações “Síndrome de Ondine” ou “Mal de Ondine” estão associadas a um conto nórdico intitulado “O sono de Ondine”. O CCHS foi descrito pela primeira vez em 1962 por Severinghaus e Mitchell em 3 pacientes operados a cirurgia da parte superior do tronco cerebral o que alertou a comunidade científica para os perigos da cirurgia e da anestesia nestes doentes. Uma reavaliação da importância dos conhecimentos destas entidades clínicas e dos riscos que os doentes podem correr encontra-se no trabalho de Muzumdar e Arens, 2008.

Estes quadros levaram à reavaliação das situações clínicas com alterações respiratórias durante o sono, que necessitassem de procedimentos anestésicos/cirúrgicos especiais para se evitarem acidentes graves (que podem ser mortais).

1.3.2. As doenças respiratórias relacionadas com o Sono: Tipologia e Classificação

Pela sua variabilidade clínica as doenças respiratórias que ocorrem em sono têm sido objeto de definições e classificações sendo os termos definidos pela Academia Americana de Medicina do Sono (American Academy of Sleep Medicine - AASM) os mais conhecidos e seguidos. Esta classificação foi revista e publicada em 2005 como segunda classificação internacional ou “International Classification of Sleep Disorders-2, ou ICSD-2 (American Academy of Sleep Medicine. ICSD-2, 2005). Uma nova classificação ICSD-3, publicada em 2014 melhorou a anterior permitindo enquadrar as patologias do sono num contexto clínico mais adequado. Exemplo disso é a definição de tipos de doenças (ex.: Narcolepsia tipo 1 e Tipo 2) mais próximos do modo como clinicamente se apresentam (ICSD 3, 2014).

As doenças respiratórias relacionadas com o sono agrupam-se em 5 entidades diferentes (cf obra citada, págs. 49 a 142): i) Síndromes de Apneia Obstrutiva em Sono – onde se incluem como entidades separadas as do Adulto e as da Criança); ii) Síndromes de Apneia Central em Sono, onde se incluem a Apneia Central Primária, a Apneia Central relacionada com padrão respiratório Cheyne Stokes, a Apneia Central relacionada com padrão respiratório periódico em altitude, a Apneia Central relacionada com alterações médicas (não Cheyne Stokes), a Apneia Central relacionada com fármacos ou tóxicos; a Apneia de Sono da Infância (que na primeira classificação era conhecida como Apneia do Sono do Recém Nascido; iii) Síndromes de Hipoventilação em Sono, onde se incluem a Hipoventilação Alveolar Idiopática Não-Obstrutiva e relacionada com o Sono, e o Síndrome de Hipoventilação Alveolar Congénita Central; iv) Quadros clínicos de Hipoventilação/Hipoxémia em Sono causados por diversas alterações médicas: Hipoventilação/Hipoxémia em Sono devido a patologia do parênquima pulmonar ou vascular, Hipoventilação/Hipoxémia em Sono devido a obstrução das vias aéreas inferiores, e Hipoventilação/Hipoxémia em Sono devido a doenças neuromusculares ou da parede torácica; e v) Sintomas Isolados e variantes do normal – ressonar e catatrenia (períodos de bradipneia caracterizados por inspiração profunda seguida de expiração prolongada e vocalizações monótonas semelhantes a gemidos).

1.3.2.1. A Apneia Obstrutiva em Sono

1.3.2.1.1. Definição

Não só pela sua frequência mas também porque é o objeto de estudo deste nosso trabalho, daremos atenção primordial à Síndrome de Apneia Obstrutiva em Sono (SAOS, ou Obstructive Sleep Apnea Syndrome - OSAS).

A SAOS é caracterizada (ICSD-3, 2014, pg. 53) por episódios repetitivos de obstrução ou colapso total ou parcial das vias aéreas superiores durante o sono, causando apneia (a obstrução total) ou hipopneia (a obstrução parcial), alterações nas trocas gasosas e perturbação do próprio sono. É a forma mais comum de alterações ventilatórias do sono (Sleep Disorders Breathing-SDB) em todo o mundo, como se tem demonstrado em diferentes estudos epidemiológicos. Há cada vez mais evidência que a SAOS é um fator de risco independente para um perfil cardiometabólico adverso (McNicholas et al., 2007) e tem sido associada a um aumento de taxas de morbilidade e mortalidade cardiovascular (Bhattacharjee

et al., 2009) e cerebrovascular, embora muito do papel causal e mecanismos patofisiológicos ainda sejam pouco percebidos (Gami e Somers, 2004). A hipertensão arterial é uma alteração comum nos doentes com SAOS independentemente de associação de outras variáveis que possam co-existir (ex. obesidade). Outra associação comum é a Diabetes tipo II embora a causa desta relação seja mal conhecida. Os doentes com SAOS podem também desenvolver Hipertensão Pulmonar e Cor Pulmonale, embora nestes casos em geral o paciente também sofre de obesidade mórbida (ICSD-3, 2014, pg.55). Mais recentemente, outras comorbilidades foram descritas como associadas ou consequência da SAOS. Entre elas encontra-se o agravamento do Glaucoma. Dados recentes apontam valores muito altos de associação entre Glaucoma e SAOS devendo entender-se que a SAOS agrava o Glaucoma de doentes que já padecem desta patologia numa proporção muito elevada (Ching-Chun et al., 2013). Estes autores estudaram 1012 pacientes com SAOS, depois de ajustarem e emparelharem para as diferentes variáveis (origem, HTA, diabetes, doença coronária, hiperlipidémia, doença renal, hipotireoidismo e número de visitas em consulta oftalmológica) e observados durante 5 anos, e concluíram que os doentes com SAOS têm um risco acrescido de 1, 67 vezes de desenvolverem Glaucoma de Ângulo Aberto. Também a associação entre alterações respiratórias e cancro têm sido exploradas. Os dados de estudos epidemiológicos em grandes coortes populacionais permitiram concluir da associação entre o cancro (em geral) e o SAOS quer no que se refere à maior incidência quer em relação à mortalidade (Javier Nieto et al., 2012 e Campos Rodriguez et al., 2013). No entanto e num estudo também recente Christensen e colaboradores, 2013, investigaram prospectivamente se a sintomatologia respiratória (ressonar, paragens respiratórias) e a sonolência diurna afetavam a incidência de cancro: de qualquer tipo ou de tipos específicos. O estudo desenvolveu-se entre 1991-93 em 8 783 indivíduos em que se recolheu informação sobre ressonar, e depois, em 1998, sobre sonolência (num subgrupo de 5 894 indivíduos da mesma população), em que se usou a Escala de Epworth para quantificar a sonolência, e a primeira incidência de cancro nessa população, seguida nos registos nacionais de cancro da Dinamarca, até o final de 2009. No geral, os autores concluem por não encontrar associação entre sintomas respiratórios em sono e incidência de cancro para a população em geral. No entanto, encontraram maior incidência de cancro em pessoas com menos de 50 anos e também maior a incidência de cancros relacionados com vírus ou doenças imunes ou com alcoolismo. Para além destas diferenças não encontraram associações específicas concluindo os autores haver evidência muito

limitada para a associação entre doenças respiratórias em sono e cancro em geral (Christensen et al., 2013). Será pois necessário esperar por mais estudos de base populacional para se poderem extrair conclusões mais sólidas.

Mas não só pelas comorbilidades esta alteração respiratória apresenta consequências para a saúde que se repercutem na actividade profissional e que podem originar problemas socioeconómicos. Entre essas consequências destacam-se: a sonolência excessiva diurna, a disfunção cognitiva, o desempenho profissional prejudicado, a ansiedade, as dificuldades nas relações pessoais, e um risco aumentado de acidentes de viação que levam à perda de vidas humanas (Marin et al., 2005). Sabendo-se que os episódios de SAOS determinam uma interrupção e superficialização do sono e mesmo múltiplos despertares é compreensível o que disso resulta: sono fragmentado, sono inadequado, sono insuficiente. Essa perturbação do sono é compensada com a sonolência e o sono durante o período diurno, inversão de sono e, consequentemente, baixa de vigília e baixa de rendimento com aumento de risco de acidentes. O sono inadequado é também causador de desregulação do padrão normal dos ciclos REM-NREM, com fragmentação deste e com consequências para a regularização homeostática perturbando inclusive a normal secreção hormonal (Malhotra e White, 2002).

Importa referir neste texto da Tese a importância dos trabalhos de Christian Guilleminault, do Centro de Estudos de Sono de Stanford - “*Stanford Sleep Disorders Center*”, na Califórnia – Estados Unidos, na definição da SAOS (Guilleminault e col., 1976, 1977) e na distinção entre SAOS e síndrome de resistência das vias aéreas superiores como entidades diferentes (Guilleminault e Chowdhuri, 2000), no entendimento das alterações hemodinâmicas que pode causar (Guilleminault e col., 1975, 1983), nos resultados dos diversos tratamentos, do nCPAP à traqueostomia (Guilleminault e col., 1981) e às cirurgias oro-mandibulares (Guilleminault e col., 2004). Sem dúvida o aporte dado por este investigador aos estudos de sono, e em particular à SAOS, são das melhores e mais importantes contribuições para o entendimento da fisiopatologia desta entidade.

1.3.2.1.2. *Epidemiologia*

A Apneia do Sono é uma patologia de grande prevalência em adultos com idade entre os 40 e os 60 anos. Atinge, portanto, uma população muito ativa, tendo por isso uma elevada importância socioprofissional. Embora apresente uma morbilidade cardiovascular e neurológica semelhante em ambos os sexos, esta patologia é em todas as séries referida como

mais frequente no sexo masculino. Os diversos estudos epidemiológicos realizados em larga escala em vários países Europeus e nos Estados Unidos da América, permitiram conhecer as taxas de prevalência nos adultos dos distúrbios respiratórios do sono. Assim, foi possível estimar, com algumas oscilações, que nos homens adultos a taxa situa-se entre os 3 e 7 por cento e nas mulheres adultas varia entre os 2 e os 5 por cento (ICSD 3, 2014). Estes números variam muito de série para série (Jennum et al., 2009), em função do grupo etário considerado, não sendo por isso consensuais (por exemplo num estudo clássico efetuado em adultos de 30-60 anos os dados epidemiológicos encontram uma prevalência de 9%, Young et al., 1993). Noutro estudo do mesmo grupo, e em que se comparam resultados de vários trabalhos realizados em diferentes etnias, encontram-se valores de prevalência de 5% (1 em 20). (Young et al., 2002).

Nas crianças os estudos epidemiológicos mostram também a importância deste quadro clínico. Nas crianças aos estudos da SAOS acrescem outras dificuldades que limitam por exemplo a análise da possível relação da obstrução que causa o ressonar e a génese da SAOS e que, nas crianças, é diferente dos adultos. Os dados epidemiológicos também variam entre séries (não só pelo hábito de estudos feitos com questionários e não com registos poligráficos; da falta de uma definição consensual do ressonar; e ainda da maior estabilidade e resistência das vias aéreas naso e orofaríngeas à modificações, pelo que a avaliação da SAOS deve ser efetuada de modo diferente (Lumeng et al., 2008; Arboledas et al., 2010). Na revisão bibliográfica deste último estudo (Arboledas et al., 2010) descreve-se que o reporte voluntário de pais e tutores revela episódios de apneia em 0,2 e 4% dos casos; aumentando quando são fornecidos questionários para resposta, reportando os estudos 4-11%. Quando os estudos reportam registos objetivos a prevalência da SAOS nas crianças oscila entre 1 e 4% aumentando para 4,69-6,6% quando em simultâneo ocorre obesidade nas crianças estudadas (Arboledas et al., 2010).

Em resumo, os dados dos vários estudos epidemiológicos apontam para percentagens que são reportadas no texto da recente classificação das doenças do sono ICSD 3, e que indicam valores de incidência de 3 a 7% em homens e 2 a 5% na mulher adulta quando se associam indicadores de gravidade da SAOS (AHI) e sonolência diurna. Porém, a prevalência dos casos em que apenas se refere o índice de apneia superior a 5/hora (sem ter em conta a hipersónia diurna) é de 24% no homem e 9% na mulher. No entanto, associando-se o sintoma de hipersónia diurna (que caracteriza bem a gravidade clínica) estes valores descem para 4%

no homem e 2% na mulher adulta, com estes valores subindo com a idade mas que, no idoso, estabiliza (ASDA, Págs. 57 e 58 da ICSD 3, 2014).

Em geral, os sinais e os sintomas clássicos da SAOS podem ser reconhecidos pelo ressonar alto, a sensação de engasgamento durante o sono, as cefaleias e o adormecimento durante o dia. Associado à SAOS é frequente o aparecimento da hipertensão arterial, da diabetes mellitus tipo II, da obesidade, do pescoço alargado, e depósito excessivo de gordura cervical, do excesso de gordura no palato mole, do aumento de volume da língua e da redução do espaço orofaríngeo, do palato mole alargado, e da mandíbula retrognática. A combinação num paciente de uma doença cardiovascular com uma SAOS grave pode aumentar em 25% a sua probabilidade de morrer. Além disso, os pacientes com SAOS apresentam incidência de acidentes de trabalho e de viação muito superiores aos indivíduos que não apresentam essa patologia. O acentuado envelhecimento intelectual e físico dos indivíduos com SAOS origina dificuldades de memória e de rentabilidade intelectual, bem como queixas de disfunções sexuais. Sobre os efeitos da SAOS nas funções cognitivas e memória Wallace e Bucks, 2013 publicaram os resultados da sua investigação e compararam os dados em meta-análise. Os resultados da comparação da performance mnésica de 2 294 indivíduos adultos com SAOS (não tratada e antes de início do tratamento) com as performances de controlos saudáveis ou dados normativos evidenciam que os doentes com SAOS estavam com as suas capacidades mnésicas significativamente alteradas para a memória episódica (verbal e visuo-espacial) quando comparados com controlos saudáveis. Os efeitos negativos da SAOS verificavam-se nos resultados para os testes de memória verbal imediata e no relembrar quando comparados com os resultados dos dados normativos. Os autores concluíram que as alterações mnésicas, de memória episódica, afetam negativamente o desempenho dos doentes com SAOS no seu quotidiano (Wallace e Bucks, 2013).

1.3.2.1.3. *Diagnóstico*

Como dissemos, a apneia obstrutiva em sono distingue-se da apneia central (em sono) porque, quando esta ocorre, há uma paragem da respiração total: toraco-diafragmática e naso-bucal (figura 8-A e 8-B). Não há fluxo aéreo. Na apneia obstrutiva em sono há esforço respiratório tóraco-diafragmático e não há passagem de fluxo aéreo naso-bucal. A distinção faz-se pelo registo da atividade respiratória, durante o sono.

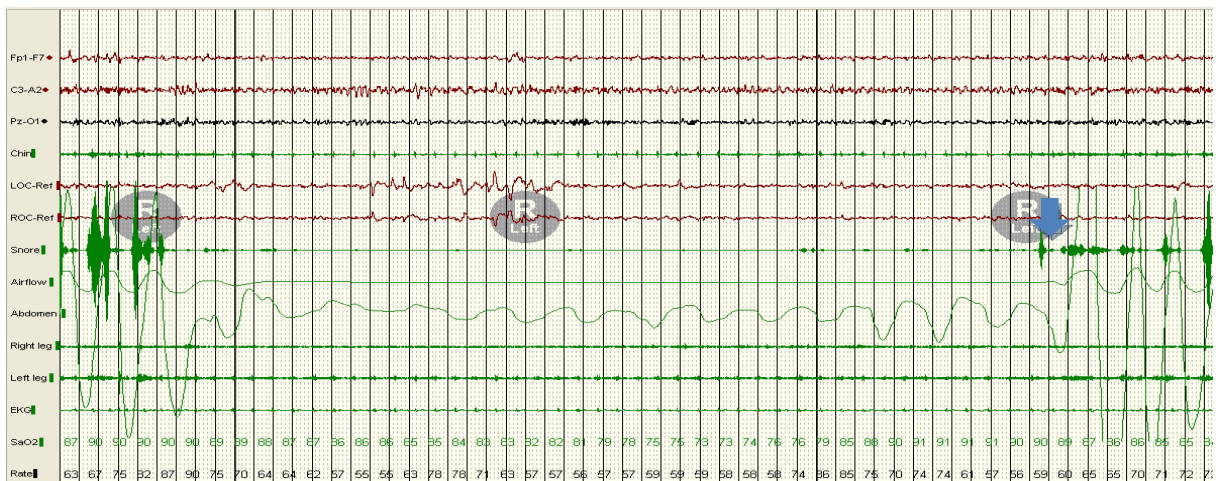


Figura 8 A - Registo de polígrafo em Sono. Exemplo de apneia obstrutiva em sono. Os diferentes canais representados registam os mesmos parâmetros e igual correspondência ao representado na Figura 4 com algumas particularidades deste registo. Assim, regista-se no canal 7 (ordenação vertical, sendo o canal 1 o traço de registo superior) o ressonar do doente. No canal 8 regista-se paragem do fluxo aéreo naso-bucal mantendo-se, no canal 9, o esforço respiratório toraco-abdominal que aumenta de amplitude antes de vencer a resistência da obstrução das vias aéreas superiores e consequentemente com a retoma do normal fluxo aéreo naso-bucal - ver seta no lado direito da figura. Para além dos canais de registo inscritos na Figura 3 neste tipo de estudos de Apneia em Sono, incluem-se ainda registo de ressonar (canal 7); de movimentos dos membros inferiores - direito canal 10, esquerdo canal 11; saturação oxigénio medida no dedo - canal 13; frequência cardíaca no canal 14. Figura adaptada de Registo Efetuado no Serviço de Neurofisiologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto.

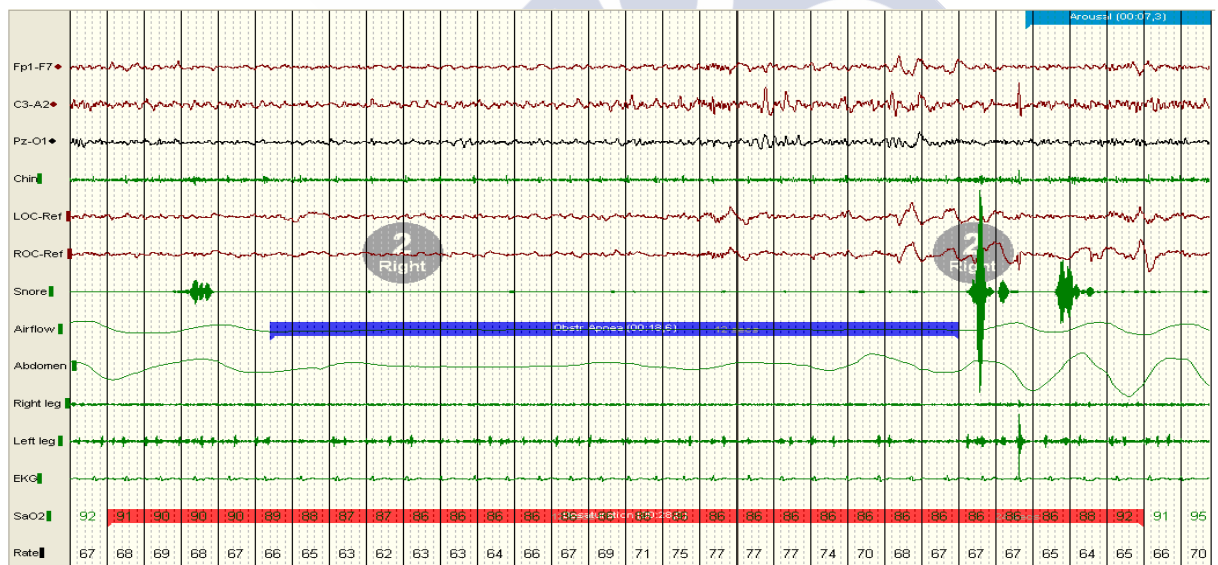


Figura 8-B Outro exemplo de Apneia Obstrutiva com marcação da duração da Apneia (o intervalo entre cada linha vertical corresponde a 1 seg.) e da Dessaturação de O2. Disposição de canais de registo idêntico ao apresentado na Figura 8-A.

Como se documenta nas figuras 8 a 11, o diagnóstico é feito pelo registo e avaliação das características do sono e da respiração, durante a noite. O registo das variáveis fisiológicas é poligráfico e inclui o registo de electroencefalograma, electrocardiograma, fluxo aéreo nasal e bucal, esforço torácico, ou expansão torácica e abdominal, saturação de oxigénio, electromiografia (para registo do tónus muscular), e o registo dos movimentos oculares. Adicionalmente procede-se ao registo dos movimentos dos membros, da posição corporal e do ressonar. A combinação dos resultados obtidos em todos esses registos permite diagnosticar a ocorrência da SAOS e em que ciclo e estágio de sono é mais frequente. Adicionalmente, em muitos casos, associam-se registos de posição, de movimentos dos membros e do ressonar (ver figuras 8A a 11).

Mas, quer a paragem do fluxo aéreo quer a respiração podem resultar de disfunção do sistema nervoso central a nível do centro respiratório. Neste caso ambos os fluxos da respiração, nasal ou bucal, bem como a respiração torácica, param. Como se depreende da observação da Figura 9A-B a cessação de fluxo aéreo naso-bucal, tal como é mostrado respetivamente nos canais de registo ordenados em 8º e 9º, e dos movimentos respiratórios tóraco-abdominais, evoca uma Apneia Central.



Figura 9A

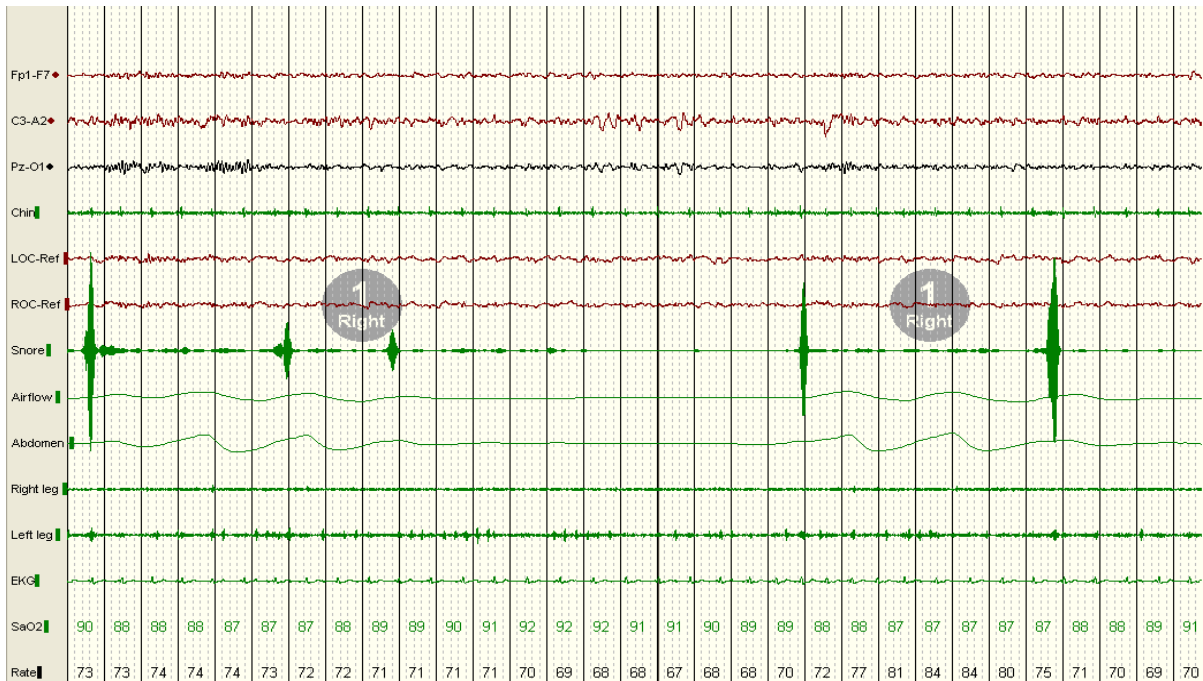


Figura 9B

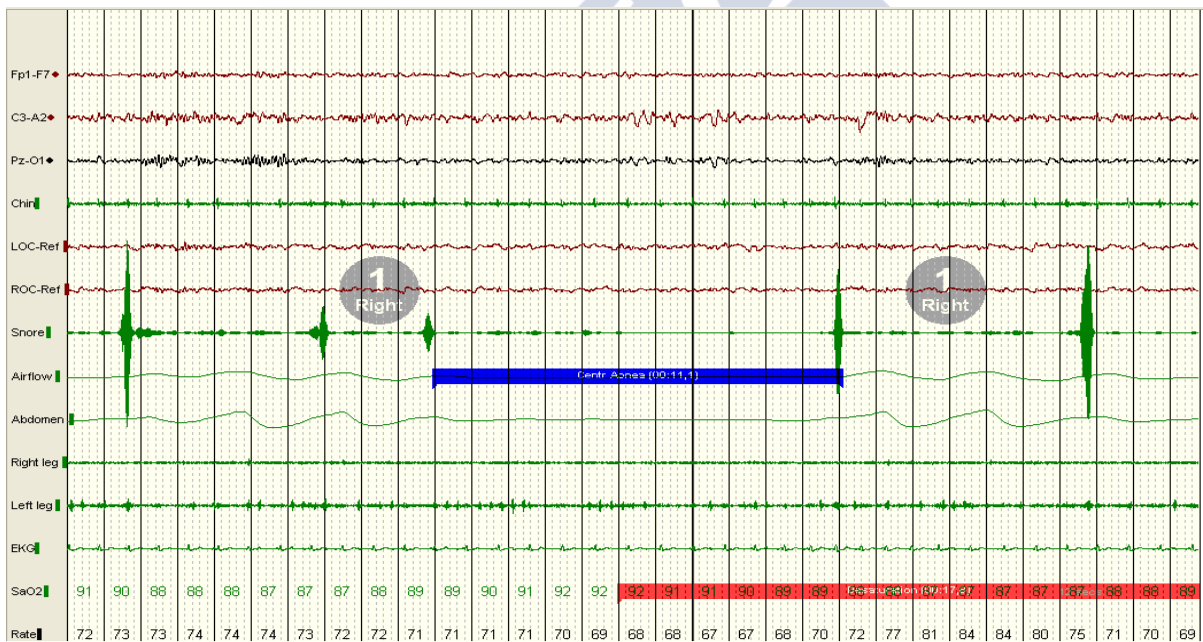


Figura 9A (parte superior) e 9B (parte inferior). Apneia Central. A ausência de registo de fluxo aéreo combinada com a ausência de movimentos respiratórios tóraco-diafragmáticos caracteriza a Apneia Central, cuja duração se observa no traço horizontal sobre a ausência de fluxo aéreo e cuja dessaturação de oxigénio e inicia depois da apneia começar e termina depois desta (Figura 9B). No resto do registo os elementos que se inscrevem têm legenda semelhante à descrita na Figura 8.

A combinação de uma cessação de corrente aérea naso-bucal com a cessação dos movimentos respiratórios tóraco-abdominais sendo esta de menor duração que a duração da cessação do fluxo naso-bucal leva ao diagnóstico de Apneia Mista (ver figuras 10).

Figura 10A



Figura 10B



Figura 10A (na parte superior) e 10B - Apneia Mista. Em 10A, os movimentos respiratórios tóraco-diafragmáticos (ver seta no canal 9 que mostra a retoma parcial - demonstrada pelas variações na linha de base) iniciam-se bastante antes da recuperação do fluxo aéreo (canal 8). Em 10B é mostrada a duração da apneia (assinalada por linha horizontal em 10B) e a consequente dessaturação.

Episodicamente as queixas iniciais dos pacientes traduzem já um compromisso respiratório que leva a dessaturação. Trata-se de casos de hipopneia que podem evoluir posteriormente em compromissos respiratórios mais graves. Essa hipopneia traduz-se graficamente por uma redução da amplitude dos movimentos respiratórios (ver figura 11).

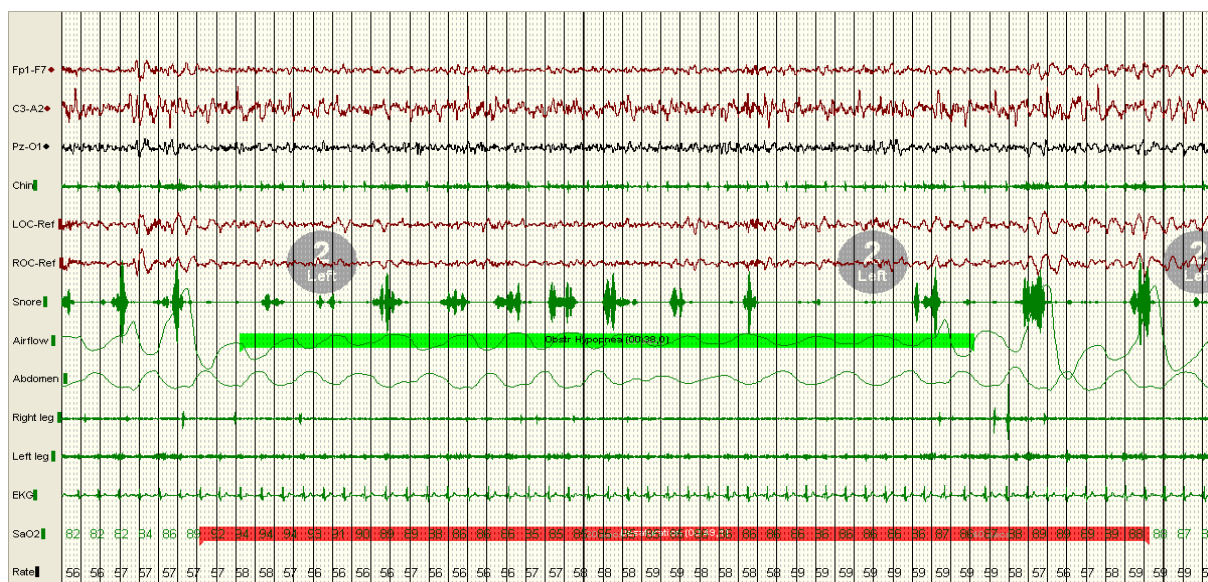


Figura 11 - Exemplo de registo poligráfico de sono em que se evidencia uma diminuição da amplitude dos movimentos respiratórios (Hipopneia) (ver canais de registo 8º e 9º). Note-se no penúltimo canal a duração da dessaturação que começa alguns segundos depois do início da hipopneia e termina depois desta.

1.3.2.1.4. Etiopatogenia

A patogenia da apneia de sono está relacionada com a redução da dimensão do calibre das vias aéreas superiores, nomeadamente na região da orofaringe, o que tem sido atribuído a diversos fatores: aumento do tecido adiposo (aumento de volume dos tecidos gordos da zona parafaríngea); alterações da estrutura craniofacial (dismorfias ou redução do tamanho da mandíbula); alargamento da estrutura dos tecidos moles circundantes (língua, paredes laterais da faringe, palato mole, etc.); lesões expansivas de natureza benigna (ex. Quisto de Thormwoldt) ou maligna. A síndrome da apneia obstrutiva de sono é pois uma condição complexa e multifatorial causada por diversos fatores anatómicos e fisiológicos. A relação entre as dimensões do canal aéreo e das estruturas naso e orofaríngeas bem como a potência desse canal aéreo ou das estruturas que o definem, tem sido evocada como estando na génese da descompensação/colapso das vias aéreas e consequente apneia (uma boa revisão encontra-se no trabalho de Kuna e Remmers, 1985 e nos estudos de Fogel et al, 2003).

Embora bastante comum, considera-se que a síndrome de apneia obstrutiva em sono está sub-diagnosticado, apresentando um índice de mortalidade e morbidade significativo. A SAOS caracteriza-se por episódios de obstrução completa ou parcial das vias aéreas superiores conduzindo a uma ausência ou baixa da ventilação com consequente diminuição do ar inspirado nos pulmões. Considera-se que estes episódios têm repercussões ventilatórias quando duram mais de 10 segundos, disso resultando uma diminuição da saturação de oxigénio (hipoxemia), havendo, em casos extremos, valores da saturação de O₂ inferiores a 60%. Disso resulta, consequentemente, um aumento da saturação de CO₂ (hipercapnia). A hipercapnia, embora determinante para a estimulação do centro respiratório, pela acidose que provoca, determina a vasodilatação e atua na troca dos valores de O₂, agravando a hipoxemia. Esta vasodilatação e a consequente estimulação da inervação da parede vascular determinam as cefaleias que de um modo frequente são referidas pelos doentes com SAOS. Os episódios de apneia, não se consideram como evocando o quadro de SAOS se inferiores a 5/hora; diz-se Ligeira a SAOS com Índice de Apneia/Hora ou IAH se superior a 5/hora e igual ou inferior a 15, Moderada se o número de apneias for entre 15 e 30/hora e Grave se o IAH for superior a 30 apneias/hora (Flemons, et al, 1999). Mas, na prática clínica considera-se que são potencialmente graves se as apneias ocorrem numa frequência superior a 15/hora (valores de IAH-Índice de Apneia/Hora, ou número de apneias que ocorrem por cada hora de sono). Estes episódios determinam alterações da estrutura do sono com consequente fragmentação. Gera-se um quadro de sono deficiente, não reparador, o doente desperta cansado e tende a dormir durante o dia. Com a persistência do quadro clínico aparece, progressivamente, incapacidade para o trabalho, e assiste-se a um “precoce envelhecimento biológico” intelectual e físico.

Traduzindo a importância e necessidade de bom diagnóstico clínico, foram reavaliadas recentemente as normas para diagnóstico e definição do quadro da SAOS em trabalho publicado pela American Academy of Medicine em 2013 (Qaseem et al., 2013) e mais recentemente, e novamente pela American Academy of Sleep Medicine, ICSD 3, 2014.

1.3.2.2. Fatores de Risco da SAOS e Comorbilidades

São considerados fatores de risco comuns na SAOS a obesidade, as anomalias anatómicas craneo faciais, a idade, o sexo, o consumo de tabaco e de álcool e na mulher o período pós-menopausa. No entanto, de todos estes, a obesidade é o grande potenciador da SAOS, podendo aumentar várias vezes o risco de apneia (Kaparianos et al, 2006). Cerca de

80% e 50%, respetivamente de populações de homens e mulheres com obesidade (Índice de Massa Corporal - IMC – igual ou superior a 30 (WHO, 2014)), desenvolve a patologia. Os indivíduos que reduzem a obesidade apresentam uma melhoria significativa da SAOS.

A relação entre SAOS e obesidade é potenciadora de comorbilidades, nomeadamente do foro metabólico e cardiovascular. (Khan et al. 2009). No trabalho reportado por Hedner e outros autores no *European Respiratory Journal* (Hedner et al., 2011) em que se fez a análise de um coorte elevado e relativo a população com SAOS de vários países europeus, a prevalência de comorbilidades em doentes com SAOS é muito elevada. Nesse trabalho os autores reportam maior prevalência de patologias sistémicas (cardiovasculares, metabólicas ou outras) em doentes com apneia obstrutiva. De acordo com esse trabalho e o resumo dos dados transcritos no quadro 4 do trabalho de Hedner et al., 2011 em que os autores comparam a incidência de comorbilidades em doentes de peso normal, com excesso de peso (IMC 25-29) e obesos (IMC \geq 30), as patologias presentes (Comorbilidades) mais frequentes foram a Hipertensão Arterial Sistémica; as Doenças Cardiovasculares; a Diabetes; e as Doenças Pulmonares numa incidência que é sempre duas vezes maior quando os indivíduos desses três grupos têm apneia obstrutiva em comparação com indivíduos dos mesmos grupos sem OSAS.

Nesse estudo expressa-se bem a importância da SAOS na ocorrência de outras patologias, sendo a prevalência destas maior aquando da associação entre SAOS e Obesidade, pelo que esta associação necessita de uma análise mais detalhada.

1.3.2.2.1. *SAOS e Obesidade*

A Obesidade como fator de risco de doenças crónicas e nomeadamente da SAOS.

O excesso de peso e a obesidade são definidos como uma acumulação anormal ou excessiva de tecido gordo que representa risco para a saúde, segundo a própria definição da OMS. A forma mais fácil e prática de se determinar a obesidade numa população é através do índice de massa corporal (IMC), ou seja, o peso da pessoa (em kg) a dividir pelo quadrado da sua altura (em metros). Uma pessoa com um IMC igual ou superior a 30 (WHO, 2014) é considerada obesa. Uma pessoa com IMC igual ou superior a 25 é considerada com peso excessivo. O peso excessivo e a obesidade são fatores de maior risco para um conjunto de doenças crónicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e cancro. Até há bem pouco tempo a obesidade era apenas considerada uma patologia de risco em países altamente

desenvolvidos, mas atualmente encontra-se em expansão em países com índices de desenvolvimento médio e baixo, principalmente nas zonas urbanas.

As últimas projeções da OMS indicam que, pelo menos um em cada três adultos da população tem excesso de peso, e cerca de 1 em cada 10 é obeso (WHO, 2014). Este problema é particularmente grave, pois está estimado que mais de 20 milhões de crianças com idades inferiores aos 5 anos apresentam excesso de peso e muitas delas já são mesmo obesas. O facto de um indivíduo ser obeso ou apresentar peso excessivo pode representar um impacto significativo sobre a saúde, pois o aumento dos tecidos gordos pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, alterações músculo esqueléticas como osteoartrites, e alguns cancros (endométrio, mama e cólon). Estas situações levam a mortes prematuras e alterações significativas na vida do indivíduo. O que não é amplamente conhecido é que o risco de problemas de saúde começa quando alguém está apenas ligeiramente acima do peso, e que a probabilidade de problemas aumenta à medida que esse indivíduo vai aumentando o peso.

Importância da Obesidade na SAOS

Num estudo longitudinal em que se avaliou a importância das mudanças de peso na SAOS constata-se que o aumento de 20% no peso corporal pode estar associado a um aumento do risco de desenvolvimento da SAOS, que pode duplicar (Peppard et al, 2000). Os mecanismos envolvendo obesidade e desenvolvimento da SAOS não são ainda totalmente conhecidos, mas acredita-se que os principais fatores estejam ligados à deposição de gordura, bem como a mudanças na função, nas vias aéreas superiores. Além disso, a obesidade também pode promover mudanças nos mecanismos centrais de controlo da estabilidade ventilatória. A existência de relações entre prevalência da SAOS e certos grupos étnicos não é consensual. Estudos populacionais realizados nos EUA sugerem que a prevalência da SAOS é maior em indivíduos negros (Afro-Americanos) (Larkin et al., 2010). No entanto, outros autores não corroboram esses resultados, reforçando a importância de outros fatores não genéticos. Existem ainda alguns dados preliminares que sugerem que outras populações mundiais também poderão apresentar uma maior predisposição para a SAOS (Veldi et al., 2010). Num estudo recente é feita uma revisão sistemática da importância da obesidade da génese da SAOS (Akinnusi et al., 2012). Estes autores resumem o papel da obesidade na SAOS pelas modificações das características estruturais da via aérea faríngea e pela redução de controlo

neuronal dos músculos que promovem o alargamento do canal aéreo que ocorre em sono e que, estando alteradas na obesidade, favorecem a tendência ao colapso desta via aérea. Um subgrupo destes doentes não é capaz de fazer a compensação quando ocorre a hipercapnia que estimula os centros respiratórios para tentar vencer esse colapso. A qualidade do sono altera-se e o doente não tem sono reparador e, conseqüentemente, adormece durante o dia. Estes autores chamam a atenção para a necessidade de se identificarem quadros de alteração alimentar, excessiva em períodos noturnos, pela importância crítica de se identificarem quadros de bulimia em sono ou síndrome de ingestão alimentar noturna pois ambos são tratáveis e representam formas de obesidade potencialmente reversíveis. Outros autores consideram que a SAOS, na sua relação com a obesidade, vai para além dos fatores anatómicos e genéticos estando integrada nas alterações metabólicas constituindo mesmo parte de uma síndrome metabólica. Segundo Coughlin et al., 2004 os pacientes com SAOS têm um risco 9 vezes superior de síndrome metabólico.

Mas também as citocinas inflamatórias tais como o $TNF\alpha$, interleucina 1b e interleucina-6 (IL-6) estão envolvidas na regulação fisiológica do sono, podendo ter um papel na etiopatogenia da Apneia de Sono (de Sousa et al., 2008). Sabe-se que o aumento da secreção ou a administração exógena destas citocinas resulta em fadiga e sonolência (Kapas et al., 1992; Opp et al., 1992), e que outros estudos confirmam que se encontram níveis elevados de leptina, $TNF\alpha$ e IL-6 quando se comparam doentes com SAOS versus controlos obesos (Vgontzas et al., 2000).

Ainda relativamente às relações entre SAOS, obesidade, e síndrome metabólico importa referir que os doentes com SAOS se queixam de ter alterações da libido. Estas resultam não só dos efeitos negativos (conjugados da SAOS, obesidade e síndrome metabólico) na ação reprodutora mas também porque as doenças de sono em si alteram a produção de testosterona ocasionando hipogonadismo e disfunção erétil. O tratamento da obesidade e da apneia melhora a produção de testosterona e a função erétil (Hammoud et al. 2012).

Em resumo, acredita-se que a hipoxia intermitente que ocorre no SAOS associada à fragmentação do sono pode levar a uma cascata de alterações endócrinas tais como a ativação autonómica o que, em associação com o aumento de fatores pro-inflamatórios, $TNF\alpha$, IL-6, resulta em aumento de metabolismo da glicose (Punjabi et al. 2005).

Deve-se admitir que diversos fatores (genéticos, ambientais, constitucionais) contribuem para o agravamento das perturbações respiratórias em sono, mas a própria SAOS, como altera o sono, altera os ritmos de produção das diferentes hormonas, tais como cortisol, insulina e hormona do crescimento entre outras, gerando-se assim um ciclo vicioso em que entram a par, a adiposidade visceral, as alterações metabólicas e as alterações cardiovasculares (Vgontzas et al. 2005).

Apesar destas conclusões que atribuem uma marcada importância à obesidade na patofisiologia do SAOS outros autores são mais favoráveis à interação e complexidade de diversos fatores, além da obesidade, que determinam a gravidade da SAOS. Fatores esses que, em associação com a obesidade (Tangugson et al., 2000), influenciam não apenas o curso da SAOS como permitem compreender que haja uma maior agregação familiar ou mesmo influência genética na ocorrência do quadro (Riha et al., 2009).

Finalmente parece-nos importante definir o papel das comorbilidades da SAOS no que respeita não apenas aos riscos mas também aos custos para o Sistemas de Saúde. Num recente trabalho, Tarasiuka e Reuveni, 2013 analisaram diversos parâmetros que podem afetar os custos da saúde em doentes com Síndrome da Apneia Obstrutiva em Sono (SAOS). Estes autores calcularam o impacto de fatores como a etnia, a baixa escolaridade e o estatuto socioeconómico nas comorbilidades de doentes com SAOS em risco de contraírem doenças cardiovasculares, sendo estes maiores nos obesos, fumadores, raça negra e em indivíduos de baixo estatuto socioeconómico. Coincidem esses doentes com os que menos aderem ao tratamento com ventiloterapia por nCPAP. Os autores consideram que os custos de casos de SAOS não tratados (que frequentemente têm comorbilidades de patologias cardiovasculares) duplicam os custos dos doentes que se tratam e que, no caso o fazem com dispositivos de pressão nasal contínua ou nCPAP, os custos dos que não aderem a estes tratamentos cifram-se em 65–82% de todos os custos médicos (Tarasiuka e Reuveni, 2013).

1.3.2.2.2. SAOS e Estruturas Craniofaciais

As alterações das estruturas anatómicas musculares e ósseas da orofaringe e face na SAOS

As estruturas anatómicas musculares e ósseas da face, naso e rinofaringe permitem a passagem de ar para a laringe, árvore traqueobrônquica e pulmão. Alterações destas estruturas têm sido investigadas como podendo contribuir, isolada ou associadamente, para a etiopatogenia da SAOS (Tangugsorn et al., 2000).

Importância da estrutura muscular (face e orofaríngea) na SAOS

Na avaliação do controlo muscular das vias aéreas superiores (nomeadamente orofaríngeas), destaca-se a atividade do músculo genioglosso. De facto, tem sido demonstrado que este músculo é um componente importante da dinâmica e da estabilidade das vias aéreas superiores, desempenhando uma função relevante na dilatação dessas vias aéreas. Baseado nesse conceito, tem sido investigada a disfunção do controlo neural do músculo genioglosso durante as fases do sono, considerando-se que poderia estar envolvida na ocorrência dos eventos respiratórios que são característicos da SAOS. Porém, a maior ocorrência de SAOS na espécie humana não foi associada a diferenças no controlo neural da musculatura dilatadora das vias aéreas diante de um estímulo hipóxico, o que contraria a importância da atividade do músculo genioglosso na SAOS. Nos estudos iniciais não foi possível demonstrar que a melhoria da SAOS pela estimulação da musculatura fosse superior a 22% (Decker et al., 1993).

No entanto, estudos posteriores em casos convenientemente selecionados e em que os dispositivos de ajuda com pressão aérea (ex. nCPAP) não são eficazes, há melhoria da SAOS pela estimulação muscular com melhoria da actividade tónica durante o sono (Kerizian et al., 2010; Van de Heyning et al., 2012).

As relações entre a obesidade e as alterações musculares ou músculo-esqueléticas cervicais e da face têm sido exploradas em diversos sentidos, em crianças, adolescentes e adultos, para se conseguir perceber o seu papel na SAOS. No estudo de Yuan et al., 2013 analisaram-se, em adolescentes, as relações entre a distribuição da gordura somática e a dinâmica da ventilação em sono. Estes autores encontraram que o aumento do perímetro do pescoço estava associado a aumento do colapso das vias aéreas aquando da hipotonia, mas não no estado ativo. Assim, consideraram que, apesar do estreitamento do perímetro pela

adiposidade cervical, haveria uma “proteção” ao desenvolvimento de SAOS dada a ativação neuromotora (Yuan et al., 2013). Estas conclusões são expectáveis para o que se passa em sono REM e em sono NREM – não só pela diferente resposta da musculatura cervical entre os dois estádios de sono – mas também a capacidade de resposta em sono e em vigília (em que neste estado de consciência a resposta muscular é melhor). Mas estas conclusões são insuficientes se pensarmos numa perspetiva longitudinal, dado que é em adultos da 4ª ou 5ª década de vida, que a SAOS mais frequentemente aparece, pelo que as razões encontradas nuns grupos etários podem não ser válidas para mais tarde.

Confirmando o trabalho de Yuan et al., 2013, sobre o papel da resposta muscular ao desenvolvimento da SAOS estavam já as conclusões precedentes expressas no trabalho de Huang et al., 2012 que estudaram 35 adolescentes obesos com SAOS (comparando os resultados com uma população emparelhada de obesos sem SAOS) e em que analisaram a pressão do fluxo aéreo durante o sono, concomitantemente com registo de EMG do Músculo Genioglosso por elétrodos intrabucais, e num modelo em que se reduzia a pressão nasal a níveis sub-atmosféricos em períodos de hipotonia e de ativação da via respiratória superior. Estes autores encontraram respostas neuromusculares vigorosas nos obesos (sem SAOS) contrariamente a obesos com SAOS, o que poderá explicar porque razão um grupo mantém reflexos protetores enquanto outro não (o grupo de pessoas que desenvolve SAOS).

Por isso, considera-se que, sendo da maior importância o normal funcionamento da musculatura basi-lingual e hióidea e a resposta adequada desta às estimulações nervosas, a estimulação do nervo hipoglosso irá ativar a musculatura da região (entre as quais o músculo hipoglosso) e ser útil no tratamento da Síndrome de Apneia Obstrutiva em Sono (Kezirian et al., 2010).

No mesmo sentido se orientam os resultados de investigações que têm sido dirigidas ao envolvimento e à importância da musculatura craneofacial na SAOS, nomeadamente do papel das medidas de reforço da mesma musculatura, como alternativa, em alguns doentes, ao tratamento com prótese ventilatória, da SAOS. No trabalho de Eastwood et al, 2011 analisa-se a importância da estimulação do nervo hipoglosso no tratamento de 21 doentes com SAOS grave e que não suportaram o tratamento com dispositivo ventilatório nCPAP. Os doentes foram estudados com polissonografia e calculado o índice de apneia/hipopneia no início de tratamento com estimulação do hipoglosso. Quando reavaliados 6 meses após estimulação

média de 5 a 6 horas/noite do nervo hipoglosso, em 19 dos 21 doentes com SAOS grave houve uma redução significativa do IAH – Índice de Apneia por Hora, destes doentes (Eastwood et al. 2011).

Todavia será importante notar-se que os valores do volume dos músculos mais envolvidos na dilatação das vias aéreas superiores (no caso da SAOS o genioglosso e o geniohioideu), são mais elevados do que nos controlos saudáveis o que pode ser resultado de edema ou excesso de gordura (Schotland et al, 1999) o que deverá ser tido em conta para a obtenção dos melhores resultados da estimulação.

A importância da estrutura óssea craneofacial na SAOS

O estudo de Löfstrand-Tideström e Hultcrantz, 2010, baseado em investigações dirigidas ao desenvolvimento do maciço craneofacial, permite-nos compreender um pouco mais o papel desta estrutura óssea no desenvolvimento de patologias respiratórias em sono.

Estes autores efetuaram um estudo comunitário em que seguiram crianças entre os 4 e os 12 anos, comparando crianças ressonadoras com não ressonadoras, nas quais estudaram as características faciais e o desenvolvimento dento-alveolar. Verificaram que as crianças que se mantinham ressonadoras aos 6 anos possuíam mordida cruzada lateral e anterior e um maxilar estreito. Numa primeira intervenção cirúrgica foi possível eliminar o ressonar mas, como não se alteraram as dimensões da maxila, a maioria pouco tempo depois voltou a rressonar. Aos 12 anos, verificou-se que tanto as crianças operadas como as não operadas, que rressonavam, tinham a face alongada e eram respiradores bucais.

O que neste estudo nos é apontado é que em crianças (e em que por isso o desenvolvimento craneofacial está a acontecer) que manifestem ressonar e perturbações respiratórias em sono ocorrem modificações das respetivas áreas de circulação aérea. Embora a redução da área de circulação aérea em algumas das dimensões da orofaringe (como pode também ser da nasofaringe) possa ser evidente, acentua-se a utilidade da análise das características anatómicas da naso e orofaringe aquando da entrada de ar, em posição supina, considerando haver características próprias da via aérea dos doentes com SAOS em comparação com os Não SAOS, como já anteriormente tinha sido reportado em outros tipos de estudos (Prachartam et al., 1994). Todavia, a correção exclusivamente cirúrgica pode não alterar o prognóstico, sendo necessário uma atuação multidisciplinar dirigida não apenas aos aspetos anatómicos ou morfológicos.

Nos últimos anos têm sido efetuados vários estudos cefalométricos que são utilizados para avaliar as características morfológicas craniofaciais de pacientes com SAOS (Battagel et al, 2000; Hans et al, 1992; Hochban et al, 1997; Tangugsorn et al., 2000; Miyao et al, 2000; Costa e Sousa e Santos Gil, 2013), ver figura 12 que nos dá em representação esquemática, a posição de pontos específicos, ósseos e das partes moles, da face, os quais se podem unir por linhas que, nos seus cruzamentos, identificam ângulos que são tidos em conta para a identificação das características morfológicas dos doentes com SAOS. Os resultados desses estudos demonstram que os pacientes com SAOS quando comparados com indivíduos sem essa patologia (populações controlo) apresentam diferenças morfológicas significativas entre as proporções do tecido esquelético e das partes moles, as dimensões das vias aéreas e as posições do osso hioide. Os pacientes com SAOS apresentam uma base craniana encurtada, com dimensões ântero-posteriores esqueléticas reduzidas. Foram ainda observados resultados variáveis quanto à posição do osso hioide nas relações de angulação craneo cervical (Davies e Stradling, 1990; Solow et al, 1993) bem como o aumento no comprimento e espessura do palato mole (Lyberg et al., 1989). A análise dos dados obtidos nas comparações do tamanho da língua não permitiu concluir qualquer relação significativa quando foram comparados os grupos de indivíduos com SAOS e sem esta patologia (Battagel et al, 1996; Lyberg et al., 1989; Prachartam et al., 1994). Um outro estudo, em que se observam consecutivamente doentes com SAOS com ou sem obesidade levou a que Riha e colaboradores concluíssem da existência de alterações da posição do osso hioide, que se encontra em posição inferior em doentes com SAOS quando comparados com controlos, e a sua provável importância na SAOS (Riha et al., 2005).

Finalmente, será importante referir que havendo diferenças na incidência da SAOS em função do género é necessário estudar se há convergência ou não do fenótipo de dismorfia facial em doentes com essa patologia. O estudo das medições antropométricas e cefalométricas de dismorfias craniofaciais em doentes com SAOS revelou que esses doentes têm diferenças nessas variáveis que são relacionadas com o género, mas que não são substancialmente diferentes das encontradas entre pessoas saudáveis desses mesmos géneros (Perri et al, 2014).

A dificuldade em obter consenso na relação entre as dimensões craniofaciais e da faringe cujas alterações levariam a maior predisposição para alguns indivíduos padecerem do SAOS, provavelmente resultará da etiologia multifatorial da doença. Um outro

constrangimento na completa compreensão da importância destes fatores nesta patologia é a existência de inúmeras limitações no planeamento metodológico dos estudos. Um dos mais importantes, é a normalização das incidências da técnica radiográfica durante a exposição, que tem o potencial de afetar significativamente as dimensões da faringe, nomeadamente se a fase da respiração não é controlada. A título de exemplo veja-se o esquema apresentado nas imagens da figura 12. Ambas as imagens apresentam vários pontos e planos de medida que devem ser referidos e respeitados quando se recolhem imagens quer em respiração normal, quer em inspiração forçada, e que divergem nessas situações. Só assim será possível conseguir-se um arquivo de dados normalizados que serão usados para comparar com os dados obtidos em doentes e posteriormente avaliar a eficácia de alguns dos tratamentos eventualmente propostos a doentes com SAOS (tais como cirurgias de “alargamento das estruturas”, ou perda de gordura ou ainda correções de outras causas obstrutivas) (Johal et al., 2007). Num trabalho recente, de Costa e Sousa e Santos Gil, 2013, em que foram estudados 187 pacientes com SAOS, encontrou-se evidência da relação entre gravidade da SAOS e parâmetros do esqueleto craneofacial. Os pacientes em que se encontrou caudalização do osso hioide e projeção facial inferior tinham SAOS mais grave. Entre as variáveis cefalométricas a redução do calibre da hipofaringe revelou-se um fator preditivo do Índice de Apneia/Hipopneia, independente da obesidade (Costa e Sousa e Santos Gil, 2013).



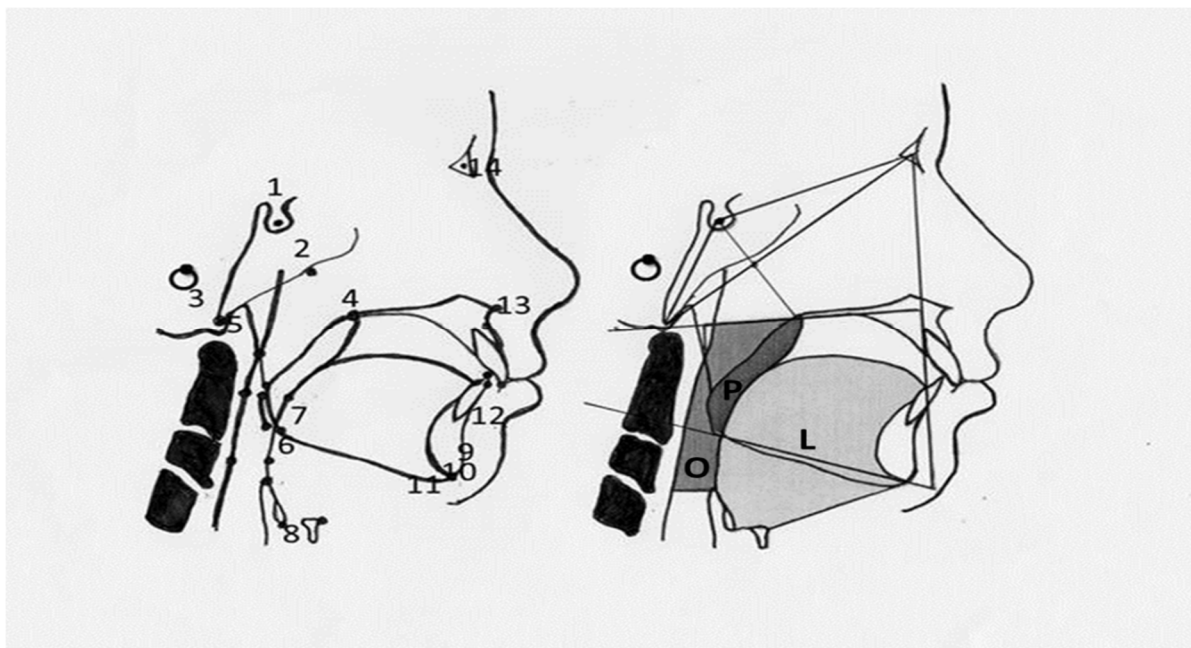


Figura 12 - Representação esquemática, em corte sagital da face e pescoço, dos pontos utilizados para determinação da posição e das relações entre partes moles (L - Língua, P - Palato mole, O - Orofaringe) e estruturas ósseas da face (as principais para os cálculos) estão enumeradas. 1 - Sela Turca; 2 - Hormion: Ponto de intersecção da placa pterigoideia com a parte posterior da base do crânio; 3 - Pórion: Ponto mais superior do meato auditivo externo e interno; 4 - Espinha nasal posterior: Ponto mais posterior do palato duro; 5 - Basion: Ponto antero-inferior do foramen magnun; 6 - Gónion: Ponto de intersecção do bordo mandibular com o plano que faz a bissecção do ângulo gonial; 7 - Parte inferior da úvula; 8 - Osso Hióide; 9 - Pogonion: Ponto mais anterior da sínfise mandibular; 10 - Gnatio: Ponto mais antero-inferior da sínfise mandibular; 11 - Mento: Ponto mais inferior da sínfise mandibular; 12 - Ponto B: Ponto anterior mais profundo da sínfise mandibular; 13 - Ponto R: Ponto de intersecção da linha naso-mentoniana com o pavimento da fossa nasal; 14 - Nasion: Ponto mais anterior da sutura fronto-nasal

Como corolário dos estudos realizados, vale a pena destacar o trabalho de Cillo e colaboradores, 2012 que reporta a relação entre dados cefalométricos específicos, índice de massa corporal e índice de apneia/hipopneia em 89 doentes com SAOS tratados com cirurgia funcional da via aérea superior, concluindo que nenhum parâmetro esquelético ou de tecidos moles pode ser diretamente ligado à SAOS (Cillo et al., 2012). Uma vez mais fica demonstrado que a aplicação de metodologias diferentes pode levar a conclusões diferentes sobre a importância das estruturas nasofaríngeas, nesta patologia.

Assim, a SAOS parece estar dependente de uma profunda inter-relação entre estruturas anatomofisiológicas que a coluna de ar vai percorrer (estruturas musculares e ósseas); da resposta dessas de estruturas a diversos estímulos; de fatores individuais e de fatores

ambientais que podem precipitar o aparecimento do quadro clínico. Entre os fatores ambientais e individuais releva-se, como antes dissemos, o papel da obesidade e de entre os individuais referem-se os resultados de estudos genéticos que têm vindo a ajudar à interpretação de possíveis razões individuais para a ocorrência do SAOS. É pois provável que fatores genéticos, anatómicos, como os da estrutura craniofacial, os tecidos moles das vias aéreas superiores, bem como a distribuição da gordura corporal, e o controlo neural das vias aéreas e da respiração estejam associados a uma maior predisposição para a SAOS.

1.4. Determinantes genéticos da SAOS

1.4.1. Identificação de genes de suscetibilidade em doenças complexas

A capacidade de mapear doenças geneticamente complexas tem sido melhorada nos últimos anos com base nos avanços tecnológicos na identificação e genotipagem de marcadores de ADN polimórficos, complementados com o desenvolvimento dos métodos estatísticos.

As abordagens de mapeamento baseiam-se no pressuposto de que uma variante genética que predispõe para a doença teve origem num ancestral comum durante a evolução, foi transmitida ao longo de gerações e pode detetar-se na população atual num número substancial de doentes. Durante a meiose os *loci* próximos, no mesmo cromossoma, tendem a ser co-transmitidos para a descendência mais frequentemente (isto é, em ligação) do que seria esperado devido ao acaso (Ott 1999, Terwilliger e Ott, 1994), uma vez que a probabilidade de ocorrência de eventos de *crossing-over* ou recombinação é baixa (<50%). A disponibilidade de marcadores genéticos distribuídos pelo genoma, tais como polimorfismos de repetição (microssatélites ou STRs), e polimorfismo de nucleótido simples (SNP), permite a localização de genes associados a doenças pela pesquisa da sua co-segregação, ao longo de gerações, com marcadores adjacentes.

Os SNPs são polimorfismos presentes nas sequências de ADN que ocorrem por alteração de um único nucleótido (A - Adenosina, T - Timina, C - Citosina ou G - Guanina) na sequência genómica. Por exemplo, um SNP pode alterar a sequência de ADN de AAGGCTAA para ATGGCTAA. Para que uma variante genética seja considerada um SNP, a sua frequência na população tem de ser > 1%. Os SNPs, que constituem cerca de 90% de toda

a variação genética humana, ocorrem a cada 100 a 300 bases ao longo das 3 bilhões de bases que compõem o genoma humano. Dois em cada três SNPs envolvem a troca da citosina (C) pela timina (T) e podem ocorrer em regiões codificantes ou não codificantes dos genes. Muitos dos SNPs não têm qualquer efeito sobre a função celular, no entanto outros predispoem as populações para a doença ou influenciam a resposta a determinados fármacos.

Estudos de associação de base populacional utilizam marcadores polimórficos que permitem uma localização de *loci* relacionados com a doença. No entanto, os estudos de associação do genoma inteiro requerem um número proibitivo de marcadores – mais de um milhão –, dificuldade que poderá ser aliviada pela definição de blocos haplotípicos. Esta abordagem permite uma redução significativa do número de marcadores necessários para o desenho e análise de estudos de associação genéticos em doenças complexas. Assim, e apesar dos estudos de associação constituírem uma abordagem eficaz para varrimento do genoma, a sua aplicação em grandes séries é ainda limitada pela capacidade de genotipagem, pelas restrições financeiras, e, ainda, pela falta de métodos estatísticos apropriados para a análise de milhares de marcadores. Por esse motivo, estudos de associação são normalmente usados para investigar pequenas regiões, quer através de (i) estudos de *fine-mapping* em regiões pré definidas, ou através de (ii) estudos funcionais ou posicionais baseados em genes candidatos (*Candidate Gene Approach*, CGA). De referir que o envolvimento genético em doenças complexas é suportado pela observação do síndrome em agregados familiares.

1.4.2. Identificação de genes de suscetibilidade para a SAOS

Como atrás foi referido, a SAOS é considerada uma doença complexa e multifatorial, pelo que a sua fisiopatologia decorre da interação de fatores genéticos e ambientais (Parish, 2013). Estudos epidemiológicos efetuados em famílias evidenciaram que a SAOS tem uma elevada agregação familiar. Estudos populacionais alargados, como por exemplo o *Cleveland Family Study* (Redline et al., 1995), estudos em outras populações (Pillar e Lavie, 1995) permitiram observar que familiares de 1º grau de probandos com SAOS, têm um risco aumentado (superior a 1,5 vezes) de desenvolver a doença, o que sugere a existência de uma base genética forte (32-36% de hereditariedade) para a síndrome. Apesar de a obesidade ser um fator confundidor nestes estudos, o *Cleveland Family Study* demonstrou agregação familiar na síndrome, mesmo na presença da obesidade. É ainda importante salientar que os

estudos efetuados com gémeos monozigóticos e gémeos dizigóticos demonstraram que os gémeos monozigóticos têm maior concordância de roncopatia e queixas associadas a SAOS. No entanto, a identificação da base genética da SAOS tem sido dificultada, quer pela ausência de um padrão de hereditariedade quer pela heterogeneidade do fenótipo clínico. Estima-se que até 40% da variância do Índice Apneia Hipopneia (IAH), ou número de apneias ou hipopneias por hora, possa ser explicada por fatores genéticos (Palmer e Redline 2003, Redline et al., 1995). Mas, como refere o estudo de Strohl et al., embora a SAOS pareça ter uma base familiar, a estrutura muscular basi-lingual e a língua estão envolvidas na génese da obstrução das vias aéreas altas durante o sono (Strohl et al., 1978).

Em 2013, Grilo et al., utilizando metodologia de CGA reportaram que a SAOS e a síndrome metabólica (SM) não partilham determinantes genéticos “major”, embora partilhem manifestações clínicas semelhantes, salientando que o principal fator preditivo para SAOS é a obesidade abdominal (medida da cintura). Referem ainda que a presença de uma variante - rs11211631 (associada ao SM) está consistentemente associada à suscetibilidade à SAOS. Já em 2012, e utilizando a mesma abordagem, Patel et al., desenvolveram um estudo em duas populações distintas, euro-africana e euro-americana e encontraram uma associação entre a SAOS e vários polimorfismos envolvidos no processo inflamatório, como por exemplo o TNF e a IL-6, entre outros. Apesar desta abordagem, até à data nenhum dos estudos efetuados foi replicado de forma consistente. Ainda nesse ano, Huang e colaboradores publicaram uma meta-análise que lhes permitiu concluir que apenas o gene TNF estava associado significativamente à SAOS (Huang et al., 2012).

Tendo por base estudos epidemiológicos, os fatores de risco que têm sido referidos como os mais importantes associados a este síndrome são, além da idade, a privação de sono, a obesidade e as anomalias craniofaciais (osteoarticulares, em particular mandibulares, e também musculares entre outras). Neste contexto, tem sido sugerido que genes implicados nas vias da obesidade (tais como a leptina), nas vias do desenvolvimento craniofacial (TGF1), no controlo neuronal das vias aéreas e da respiração (HTR2A), no desenvolvimento da estrutura dos tecidos moles (IGF1R), no controlo das vias respiratórias superiores, nos componentes da síndrome metabólica (leptina, recetor da leptina, TNF, APOE) e na inflamação, possam contribuir para a SAOS, podendo, ainda, influenciar a expressão do seu fenótipo clínico.

Com base na literatura, e considerando os fenótipos, obesidade, tecidos moles, estrutura craniofacial, foram selecionados para este estudo um conjunto de genes e SNPs. A sua localização cromossômica e funções específicas são descritas de modo esquemático no capítulo Anexos. Os genes da APOE e do Complexo Major de Histocompatibilidade/HLA, sendo dos mais referidos na literatura como implicados na SAOS, são de seguida abordados.

APOE

O gene da apolipoproteína E (APOE) tem sido referido como um potencial gene modificador da suscetibilidade para a SAOS. A APOE é uma glicoproteína componente dos quilomicra (lipoproteína plasmática que se forma nas células intestinais e transporta os triglicerídeos exógenos) e da VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Desempenha um papel fundamental no metabolismo dos triglicerídeos (dietários e endógenos). Está envolvida na regulação dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, *Low-Density Lipoprotein*) e colesterol, atuando como um forte ligando para o recetor de LDL e mediando o transporte reverso de colesterol para as células (Campalani et al., 2006). Para além do seu papel bem definido no transporte lipídico, existem evidências de que a ApoE participa na inflamação, tem, ainda, efeitos neurotóxicos, antioxidantes e imunomoduladores (Zhang et al., 2011; Maehlen et al., 2013; Raber, 2008).

A ApoE é produzida em vários tecidos, com concentrações mais elevadas no fígado, cérebro, rins, linfócitos, macrófagos e tecido adiposo (Egert et al., 2012).

O gene da ApoE localiza-se no cromossoma 19q13, e polimorfismos neste *locus* resultam em três isoformas da proteína, designadas de $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ (Campalani et al., 2006). Estas isoformas exibem características patofisiológicas/fenotípicas distintas e têm sido associadas a diferenças nos perfis lipídicos. A sua implicação está bem documentada em várias patologias, entre as quais a doença de Alzheimer (Poirier et al., 1993), a doença de Parkinson (Jasinska-Myga et al., 2007), a aterosclerose (Hixson, 1991) e a hiperlipoproteinemia tipo III (Niu et al., 2007) (Figura 13).

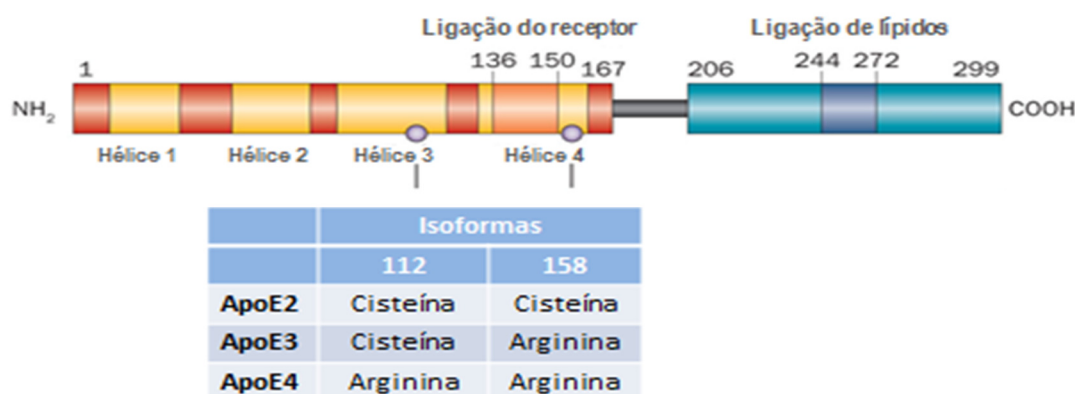


Figura 13. Isoformas proteicas da ApoE. As isoformas produzidas por estes alelos diferem na composição de aminoácidos (CYS - cisteína ou ARG-arginina) nas posições 112 e 158 da proteína (Weisgraber et al., 1981; Weisgraber et al., 1982; Mahley e Huang, 1999). O alelo E2 possui o aminoácido cisteína nas duas posições, o E3, alelo mais comum da ApoE, é caracterizado por uma cisteína na posição 112 e uma arginina na posição 158, enquanto o E4 possui arginina nestas duas posições. (Adaptado de: Liu, C. *et al.* (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy *Nat. Rev. Neurol.* doi:10.1038/nrneurol.2012.263)

De forma inconsistente, tem sido descrita a associação dos alelos E2 e E4 do gene da APOE com a SAOS. Dois de um total de oito artigos verificaram que o alelo E2 é um alelo de suscetibilidade para a SAOS (Larkin et al., 2006; Uyum et al., 2015). Da mesma forma, dois de um total de onze artigos observaram que o alelo E4 é um alelo de suscetibilidade para a SAOS, podendo, ainda, estar associado a uma maior severidade da doença (Gozal 2007; Kadotani 2001). No entanto, Larkin et al., 2006, referem que a presença deste alelo confere proteção ao desenvolvimento da SAOS.

A maioria destes estudos não foram replicados e, por isso, o conhecimento atual tem de ser fortalecido. A investigação dos alelos do gene da APOE em doentes portugueses com SAOS será abordada na secção dos resultados deste trabalho.

Os genes do Complexo MHC/HLA

Os genes do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) designado Human Leucocyte Antigen (HLA) no humano, também têm sido investigados em doentes com SAOS. Os resultados têm-se revelado inconsistentes e até contraditórios. Estudos realizados em doentes japoneses com SAOS demonstraram que a frequência do alelo HLA-A2 estava significativamente aumentada, quando comparada com uma população controlo emparelhada para género e idade. Foi ainda observado que indivíduos em cujo genótipo o alelo HLA-A2

estava presente eram mais obesos do que os que não possuíam esse alelo, o que, segundo os autores, sugere uma associação entre esse alelo e a obesidade (Yoshizawa 1993).

A principal função do sistema HLA é a apresentação de peptídeos antigénicos a Linfócitos T promovendo a sua ativação. A presença de um dado alelo HLA pode afetar diretamente a capacidade de ligação ao péptido e modular a respetiva resposta imune e, portanto, o processo inflamatório. Os genes HLA estão localizados no braço curto do cromossoma 6, na porção 6p21.3, e abrangem cerca de quatro milhões de pares de bases. Considera-se a existência de três regiões designadas por Classes I, II e III, cuja disposição cromossómica foi estabelecida com base em estudos familiares (Figura 14).

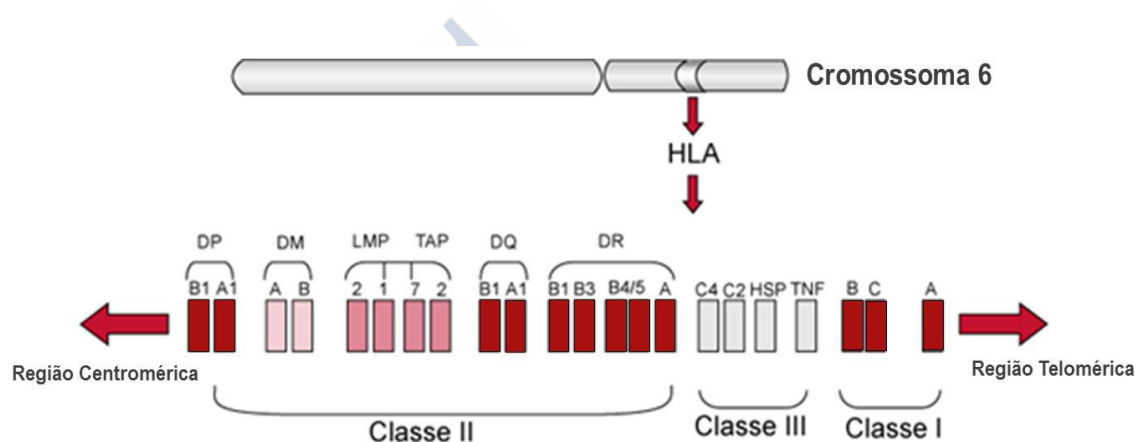


Figura 14 - Localização do Complexo Major de Histocompatibilidade (HLA) e respetivas Classes no Cromossoma 6.

A primeira investigação consistente sobre o papel dos antígenos HLA na doença foi realizada em 1973 (Brewerton et al., 1973). Esse estudo permitiu observar que alelo HLA-B*27 estava presente em 95% de doentes com Espondilite Anquilosante, frequência essa cerca de 20 vezes superior à frequência observada na população em geral. A implicação dos genes HLA, quer da classe I quer da classe II na doença, está bem documentada em mais de 500 patologias, em particular nas de foro autoimune, inflamatório e infeccioso. O melhor exemplo dessa associação é com a Narcolepsia, que é uma patologia do Sono, na qual a associação com o alelo HLA-DQB1*0602 pode, em algumas populações, como por exemplo na Japonesa, atingir 95 a 100% (Miyagawa 2010; Martins da Silva et al., 2014). De referir que a associação entre alelos do Sistema HLA e determinadas doenças, nomeadamente as de carácter multifatorial e multigénico, pode variar com a etnia e ser ainda condicionada pelo

meio ambiente. A investigação dos alelos HLA em doentes portugueses com SAOS será abordada na secção dos resultados deste trabalho.

De referir que estudos efetuados em modelos animais também têm permitido confirmar a existência de uma base genética para a SAOS através do envolvimento dos genes implicados no controlo da obesidade, bem como o controlo da ventilação, da morfometria craniana e da hipóxia, como anteriormente referido.

O mapeamento dos *loci* da suscetibilidade à SAOS é dificultado por vários fatores. A elevada frequência na população dos genes descritos como associados a esta síndrome, a existência de uma penetrância incompleta, a ocorrência de fenocópias e a heterogeneidade genética são alguns exemplos. Uma dificuldade acrescida no estudo destas associações é, ainda, o fato de uma dada característica (da síndrome) poder ser determinada por diversos genes. Por exemplo, estudos em ratinhos sugerem que diferentes genes podem influenciar o desenvolvimento craniofacial.





2. Capítulo 2.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Tendo como base o contexto de evolução e conhecimento do quadro clínico da Síndrome de Apneia Obstrutiva em Sono (SAOS) definimos como objetivos gerais deste trabalho:

- Caracterizar clínica e electrograficamente uma população de doentes com suspeita de SAOS que, num determinado período, frequentaram a Consulta de Sono do Hospital de Santo António/Centro Hospitalar do Porto, no Porto.
- Avaliar as relações entre a SAOS e fatores individuais, nomeadamente a obesidade e risco de comorbilidades.
- Avaliar a importância dos polimorfismos genéticos de genes relacionados com a obesidade, estrutura craniofacial, e os “tecidos moles” na suscetibilidade à SAOS.
- Avaliar a importância de fatores genéticos (alelos HLA e APOE) nessa população de SAOS.

A concretização destes objetivos gerais destina-se a permitir responder a duas questões. Essas questões são:

- 1 - Existem fatores individuais geneticamente determinados que estão associados à SAOS ou que são mais comuns em doentes com SAOS?
- 2 - Esses fatores atuam isoladamente ou, para a SAOS se manifestar, têm de estar associados?

A resposta a estas questões é da maior importância para o entendimento da patofisiologia da SAOS.





3. *Capítulo 3.* ***MATERIAL E MÉTODOS***



MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

O projeto foi apresentado e submetido para análise à Direção do Hospital de Santo António do Centro Hospitalar do Porto (HSA-CHP) e respetiva Comissão de Ética, tendo obtido as autorizações para a realização. Todos os indivíduos estudados tiveram conhecimento das particularidades da investigação a realizar, tendo assinado um documento de consentimento informado. Este incluía autorização expressa para colheita de sangue e informação clínica para estudos genéticos (em anexo).

Do universo de doentes estudados prospetiva e consecutivamente na consulta de sono do hospital, foram referenciados 324 indivíduos que potencialmente preenchiam os seguintes requisitos: necessidade de registo poligráfico noturno por suspeita de sofrerem de patologia do sono: SAOS, roncopatia, narcolepsia, movimentos periódicos ou outras patologias identificadas segundo os critérios da classificação da American Academy of Sleep Disorders (ISCSD 2, 2005 e ICSD 3, 2014).

Excluíram-se doentes que não quiseram aderir ao estudo, que por quaisquer razões não efetuaram polissonografia ou que não efetuaram colheita de amostra de sangue.

No final restaram para este estudo 291 indivíduos que, após entrevista explicativa do âmbito do projeto, efetuaram registos poligráficos de sono noturno e respetiva colheita de sangue no Serviço de Neurofisiologia do HSA-CHP no período compreendido entre Outubro de 2009 e Agosto de 2010. Destes completaram os diversos estudos 284 pacientes e que são reportados nesta Tese.

Os registos poligráficos, a informação clínica e os estudos laboratoriais, incluindo genéticos – foram efetuados no mesmo Hospital (no Serviço de Neurofisiologia os estudos poligráficos de sono; no Serviço de Química Clínica os estudos analíticos de rotina no sangue). As amostras biológicas foram referenciadas para os estudos genéticos posteriormente realizados quer no Instituto Gulbenkian de Ciência – Oeiras quer no Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Em toda a população, foi recolhida, através de um inquérito (anexo), informação clínica da patologia que motivou a consulta, classificação das patologias do sono, patologias associadas, escala de sono, bem como a primeira apreciação diagnóstica: situação clínica do indivíduo estudado incluindo patologias prévias e comorbilidades associadas, história familiar de patologias, idade, sexo, peso e altura para cálculo do índice de massa corporal, profissão, escolaridade, hábitos sociais e tabágicos.

No que respeita aos estudos genéticos foi utilizada uma população controlo constituída por 279 indivíduos (nos estudos HLA/SAOS só foram utilizados 223 destes e nos estudos APOE/SAOS apenas 185) sem qualquer tipo de patologia do sono e oriundos da mesma região geográfica dos doentes.

3.2. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

O inquérito que resume as informações clínicas é referido no Anexo. Foi preenchido imediatamente antes do registo noturno, e após ter sido obtida a assinatura do consentimento expresso, tal como é referido nos Anexos.

Todos os pacientes foram registados durante uma noite de sono no período compreendido entre as 22:00 e as 7:00 da manhã seguinte. O registo de sono noturno incluiu registo vídeo-poligráfico de: 3 canais de Electroencefalograma - EEG (Fp1-F7, C3-A2 e Pz-O1 – colocação de elétrodos segundo a nomenclatura de sistema internacional 10-20); 2 canais para Electro-oculografia - EOG (para estudo de movimentos oculares verticais e horizontais, dos olhos direito e esquerdo); 1 canal de Electrocardiografia - ECG (derivação DII); 3 canais para Electromiografia - EMG (músculos mentonianos e membros inferiores); 1 canal para a avaliação do fluxo aéreo naso-bucal; 1 canal para estudo da respiração toraco-diafragmática; 1 canal para inscrição da saturação de O₂ a nível periférico (num dedo da mão). Este procedimento técnico inclui o registo contínuo do tempo em horas, minutos e segundos (hh:mm:ss) para correlação com imagens e estudos de comportamento (o registo poligráfico obtido, com as diversas variáveis registadas está esquematicamente representado nos exemplos das Figuras 4 a 6). Após o registo noturno, na manhã seguinte, foi efetuada uma colheita de 10 ml de sangue venoso, em tubo de EDTA, recolhido no antebraço dos doentes que tinham dado o seu consentimento expresso.

3.3. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL

3.3.1. Seleção e Avaliação dos Marcadores Genéticos

A seleção dos genes e dos polimorfismos a analisar foi efetuada através de pesquisa bibliográfica em bases de dados públicas, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI), Ensemble e Hapmap.

Essa seleção baseou-se no conhecimento prévio de genes denominados candidatos, cuja função biológica é conhecida e possa sugerir a sua implicação na doença e/ou cuja localização corresponda a uma região previamente identificada como envolvida nos parâmetros a analisar neste trabalho. De acordo com o descrito em 1.4.2. e expresso no quadro que se encontra em anexo, selecionaram-se para estudo 88 variantes genéticas no mesmo ou em diferentes genes.

Nesse quadro descrevem-se alguns dos genes que têm sido referenciados na literatura como podendo estar associados à SAOS e que foram selecionados de acordo com a sua frequência em populações de descendência europeia.

3.3.2. Estudo dos Polimorfismos Genéticos

Para a genotipagem dos polimorfismos foi colhido sangue periférico dos doentes e da população controlo para tubos com 5% de EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) e o ADN foi extraído pelo método clássico de “Salting Out” (Miller et al, 1988). Esta técnica, baseada na baixa solubilidade das proteínas na presença de elevadas concentrações de sais, permite a obtenção de ADN de elevado peso molecular e de boa qualidade. Os procedimentos enunciados em 3.3.3 e 3.3.4 foram desenvolvidos no Laboratório de Imunogenética do ICBAS-Universidade do Porto. O procedimento 3.3.5. foi efetuado no Instituto Gulbenkian de Ciência – Oeiras.

3.3.3. Quantificação do ADN

A pureza e a concentração de ADN foi avaliada por determinação da densidade ótica com recurso à espectrofotometria a um comprimento de onda de 260 nm *Nanodrop (ND-1000)*. A partir dessa informação, procedeu-se à preparação de soluções de trabalho através da diluição com Água Bidestilada Estéril. As soluções de trabalho, de concentração de 50 ng/μl, assim como as placas de trabalho de concentração final de 12,5 ng/μl foram obtidas por

diluição com tampão TE das soluções originais. Apenas foram consideradas para o estudo as amostras cujas razões de absorvência de 260/230 nm para sais orgânicos e de 260/280 nm para proteínas, apresentavam um valor entre 1,8-1,9 ou seja isentas de contaminação. O ADN foi armazenado a - 20° C para posterior identificação genética.

3.3.4. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase é uma das técnicas de eleição em biologia molecular muito utilizada para identificar e /ou quantificar polimorfismos de genes (Olerup e Zetterquist, 1992). É um método que permite amplificar fragmentos específicos de ADN, originando milhares de cópias de uma determinada sequência. Processa-se em três fases distintas: 1. Desnaturação do ADN genómico 2. Emparelhamento dos “*primers*” (Annealing) 3. Extensão da cadeia de ADN pela enzima Taq polimerase

3.3.5. Genotipagem dos *Single Nucleotides Polymorphisms*

Os SNP's foram identificados através do método iPLEX (Plataforma Sequenom MassARRAY, USA). Com esta tecnologia é possível genotipar até 40 SNP's em simultâneo. Para a identificação dos 88 SNP(s) foram construídos 3 Plexs e analisadas amostras de ADN de 288 pacientes e de 260 indivíduos da população controlo. Foi usada uma concentração de ADN de 12,5 ng/μl.

Este método compreende uma reação inicial de PCR, de forma a amplificar as regiões de interesse, à qual se segue uma reação de extensão utilizando “*primers*” com massa modificada que hibridizam na região adjacente ao polimorfismo de interesse. Numa fase final, utilizando um espectrómetro de massa e o software *Analizertyper* do Sequenom, é obtido (isto é “gerado”) o genótipo de cada amostra. O sistema permite corrigir possíveis erros de leitura e interpretação de dados (ver representação esquemática na Figura 15).

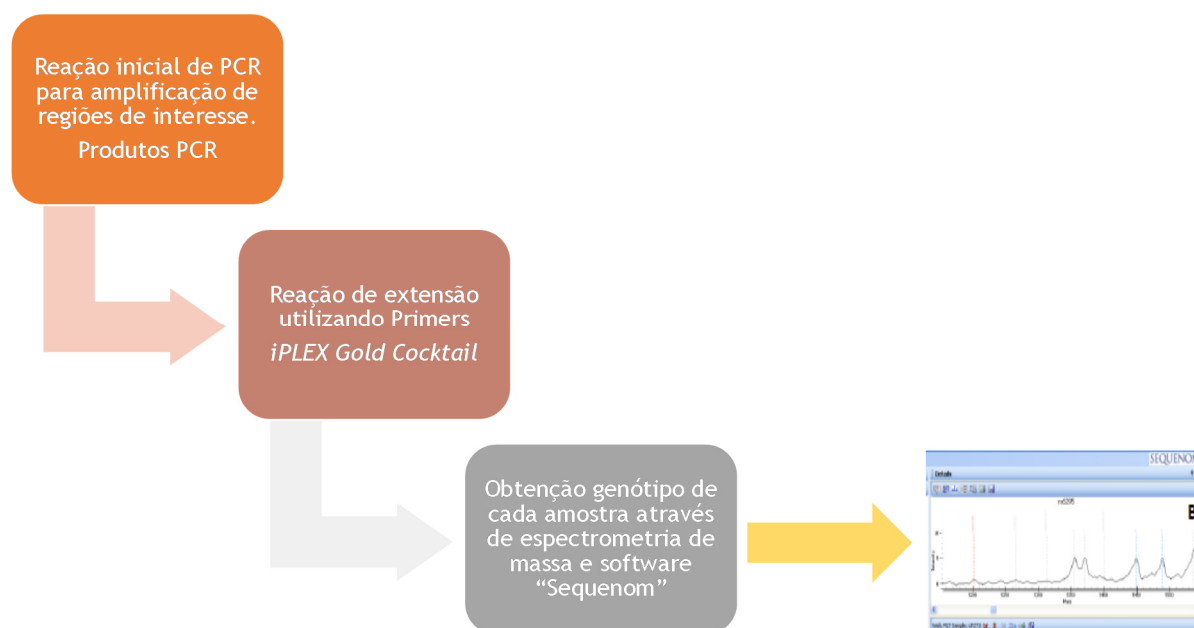


Figura 15 - Esquema da técnica iPLEX do Sequenom para genotipagem de acordo com os procedimentos recomendados no guia de protocolo de 2008 da BioTechniques, disponível em www.sequenom.com. A análise de espectrometria de massa indicada na parte direita inferior da figura, representa um dos resultados obtidos na análise dos nossos estudos, conforme pode ser verificado na figura 30 em 4.4.2.

3.3.6. Identificação dos alelos HLA

Para a genotipagem dos alelos HLA recorreu-se a um método específico de PCR designado por PCR-SSP (*Sequence Specific "Primers"*). A metodologia de PCR-SSP baseia-se no uso de "*primers*" que discriminam vários alelos ou grupo de alelos durante o processo de PCR e como tal os "*primers*" são utilizados de forma eficaz. Os pares de "*primers*" são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de "*primers*" com correspondência perfeita, traduzem-se na amplificação de sequências alvo enquanto que pares de "*primers*" sem correspondência não traduzem qualquer amplificação.

Para a amplificação dos alelos do *locus* HLA, foram preparadas 24 misturas de "*primers*" multiplexados. Cada mistura é constituída por um par de "*primers*" necessários para deteção de cada alelo e por um outro par de "*primers*" que é usado como controlo interno.¹

¹ No contexto do conhecimento da estrutura dos genes HLA, são desenhados "*primers*" "home made" cuja sequência é enviada posteriormente para síntese. Após a sua receção, são utilizados para a elaboração de *kits* caseiros que permitem a determinação/identificação dos alelos HLA. A importância deste procedimento reflecte-se quer em termos económicos (o custo é aproximadamente 10 vezes inferior à utilização de *kits* comerciais), quer na contribuição de conhecimento/técnica científica para o laboratório.

3.3.7. Identificação das isoformas da Apoliproteína E

A genotipagem da APOE foi efetuada através da técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), que permite detetar diferenças entre sequências homólogas de ADN. Consiste na fragmentação do produto da PCR, obtida pela ação de enzimas de restrição, que reconhecem determinadas sequências nucleotídicas, específicas do ADN, promovendo o seu corte. Os fragmentos gerados são separados através de uma electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida constituindo padrões de restrição específicos. A visualização, à luz ultravioleta, destes padrões após coloração com brometo de etídio permite a identificação das diferentes variantes alélicas.

Todas as identificações genotípicas - doentes e população controlo - foram obtidas sem conhecimento da origem da amostra. Amostras em duplicado/triplicado foram colocadas nos PLEX, para avaliação do controlo de qualidade, assim como controlos positivos e negativos.

3.3.8. Análise Estatística

3.3.8.1. Parâmetros demográficos e clínicos

Os parâmetros demográficos e clínicos foram avaliados tendo em conta cada um dos grupos de populações, ou seja, pacientes com SAOS, com outras doenças do sono, e população controlo.

Avaliamos a distribuição por sexo, idade e características clínicas (altura, peso, IMC), escalas de sono e comorbilidades associadas.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS v.22 (*Statistics Package for the Social Sciences*).

3.3.8.2. Estudos de associação

As frequências alélicas e genotípicas para cada polimorfismo, observadas na população de doentes e na população controlo foram obtidas por contagem direta. Para a comparação das frequências génicas entre a população de doentes e população controlo, foi utilizado o Teste de χ^2 ou Teste Exato de Fisher conforme apropriado. Os Odd Ratio (OR) e os respetivos Intervalos de Confiança (95% CI) foram calculados como uma aproximação ao Risco Relativo. Este risco quantifica a probabilidade de um indivíduo com um determinado alelo desenvolver a doença quando comparado com indivíduos que não o possuem. Para as

variáveis contínuas foi apresentada a média (desvio padrão, DP). As variáveis contínuas (idade e IMC) foram avaliadas quanto à sua distribuição através do teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov. Por apresentarem distribuições normais, utilizou-se o teste t – Student para comparação das médias entre os diferentes grupos.

Para identificação das variáveis que influenciam o desenvolvimento da doença foi efetuada uma análise por regressão logística do tipo backward onde todas as variáveis independentes são introduzidas ao mesmo tempo. As variáveis menos significativas foram retiradas até que a eliminação de uma nova variável independente não acrescentasse mais informação ao modelo. Este método permite avaliar as relações de dependência de uma variável a partir do comportamento de uma ou várias variáveis independentes.

Todas as análises foram efetuadas recorrendo ao *software* SPSS versão 22 (SPSS, Chicago Illinois, USA). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Inicialmente o programa utilizado para a realização do teste de associação entre populações, foi o Arlequin (número de permutações 100). Devido ao número de permutações ser baixo, o teste utilizado ser o *qui quadrado*, e do tempo para obter valores ser excessivo, optamos por realizar os testes de associação no *Haploview*.

Caracterização do Software utilizado:

Haploview: É uma ferramenta geralmente usada em *software* de bioinformática através da qual se deseja analisar e visualizar testes padrões de desequilíbrio de ligação em dados genéticos. O haploview fornece também a funcionalidade de execução de testes de associação, escolhendo TagSNPs e estima as frequências haplotípicas.

Plink: É um *software* que gera uma série de estatísticas de resumo que são úteis para controlo de qualidade (por exemplo, frequência génica, frequência do alelo menor, falhas de Hardy-Weinberg e frequências de transmissão não-mendeliana). Estas informações também podem ser usadas como limites para análises posteriores.

3.3.8.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O modelo de Hardy-Weinberg permite-nos comparar a atual estrutura genética de populações ao longo do tempo com a estrutura genética que seria de esperar se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se as frequências dos genótipos forem diferentes do que seria de esperar em equilíbrio, significa que os pressupostos do modelo foram violados.

3.3.8.4. Meta-Análise

Revisão sistemática e meta-análise

Pesquisa de artigos e Critérios de inclusão

Foram utilizadas as bases de dados MEDLINE e EMBASE para efetuar a pesquisa de estudos sobre ApoE e SAOS reportados até Setembro 2015. A pesquisa foi feita utilizando as seguintes palavras-chave: “*sleep disordered breathing or SBD*” [termo MeSH] ou “*Obstructive Sleep Apnoea or OSA*” [termo MeSH] ou “*Obstructive Sleep Apnoea Syndrome or OSAS*” [termo MeSH] e “*Apolipoprotein E or Apolipoprotein E4*” [termo MeSH] ou ApoE. Todas as referências destes resultados foram exploradas para se identificarem estudos adicionais não indexados nas bases de dados MEDLINE ou EMBASE. Os estudos considerados nesta meta-análise obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: (1) reportar dados originais de estudos independentes; (2) apresentar os valores de Odds ratio (OD's) e o intervalo confiança (95% CI) ou dados suficientes para calcular estes parâmetros; (3) publicação numa revista com revisão por pares; (4) Genotipagem de todas as isoformas da APOE; (5) estudos de coortes, estudos de caso-controlo ou estudos familiares em que haja estudos de caso e população controlo; (6) se várias publicações do mesmo grupo fossem encontradas escolhíamos a mais completa e com os resultados mais recentes.

Recolha de dados

De cada um dos estudos incluídos foi obtida informação relevante para a meta-análise, nomeadamente: nome primeiro autor, ano publicação, país, etnia, características clínicas e critérios inclusão doentes, características demográficas, número de doentes e controlos em cada um dos genótipos, OR e 95% CI. As divergências foram resolvidas por consenso.

Análise estatística e viés de publicação

O valor de OR e respetivo intervalo de confiança (95%CI) foram calculados com base no modelo de efeito aleatório com o programa estatístico *Comprehensive MetaAnalysis* (Biostat, USA). Foram feitos os respetivos gráficos de *Forest plots*. A heterogeneidade entre publicações foi calculada pelo teste Q. Quando o valor de P foi inferior a 0,1 considerou-se que existia heterogeneidade entre os estudos. O grau de heterogeneidade foi calculado pelo valor de I^2 (<25% = sem heterogeneidade, 25-50% = moderada, 50-75% = alta e >75% = heterogeneidade extrema). O viés de publicação foi avaliado pelo teste de Begg and Egger.







4. *Capítulo 4.* ***RESULTADOS***



RESULTADOS

De acordo com o exposto em 3.1. completaram-se os estudos de sono em 284 doentes com diversas patologias de sono, caracterizados por diagnóstico clínico e neurofisiológico (registo poligráfico de sono noturno). Para os estudos genéticos os dados desta população foram comparados com uma população controlo saudável, com as mesmas características demográficas. Deste grupo geral de 284 pacientes, o diagnóstico de SAOS e a consecutiva definição de apneia de sono e gravidade da mesma foram efetuados segundo os critérios da ASDA, ICSD3, 2014. De acordo com estes critérios de classificação da gravidade das alterações respiratórias, consideraram-se como não tendo apneia os pacientes em que o índice de Apneia/Hipopneia era igual ou inferior a 5 por hora ($AHI \leq 5/\text{hora}$). Estes doentes foram excluídos da análise da SAOS e incluídos no grupo de outros diagnósticos de alterações ou patologias do sono.

Para além dos 128 doentes com SAOS, os quais foram constantes nos diversos estudos, os registos e a informação clínica permitiram identificar outros diagnósticos: 12 pacientes foram diagnosticados como tendo Narcolepsia, 21 como tendo outras Hipersónias, 56 como tendo Movimentos Periódicos dos Membros Inferiores em Sono e 67 pacientes com Outras Patologias do Sono (insónias, parassónias e outras).

Todos os doentes incluídos no grupo geral de patologias de sono ($n=284$) foram também estudados nas suas componentes genéticas.

Os resultados obtidos respeitantes à análise do grupo geral de patologias de sono e à análise dos doentes com SAOS são, em seguida, apresentados. Para cada uma das análises os doentes estudados provêm desta coorte de doentes com SAOS mas os resultados podem referir-se a pequenas variações populacionais, consoante foi possível ou não, por razões individuais ou laboratoriais, avaliar as características de todo o grupo. Essas diferenças populacionais estão expressas nos estudos da APOE (113 doentes), do HLA (131 doentes), e no estudo das Comorbilidades (128 doentes).

4.1. ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICOS

4.1.1. Sexo e idade

Dos 284 casos de doentes incluídos na amostra, 199 (70,7%) eram do sexo masculino e 85 (29,9%) do sexo feminino, numa proporção de 2:1 (Figura 16).

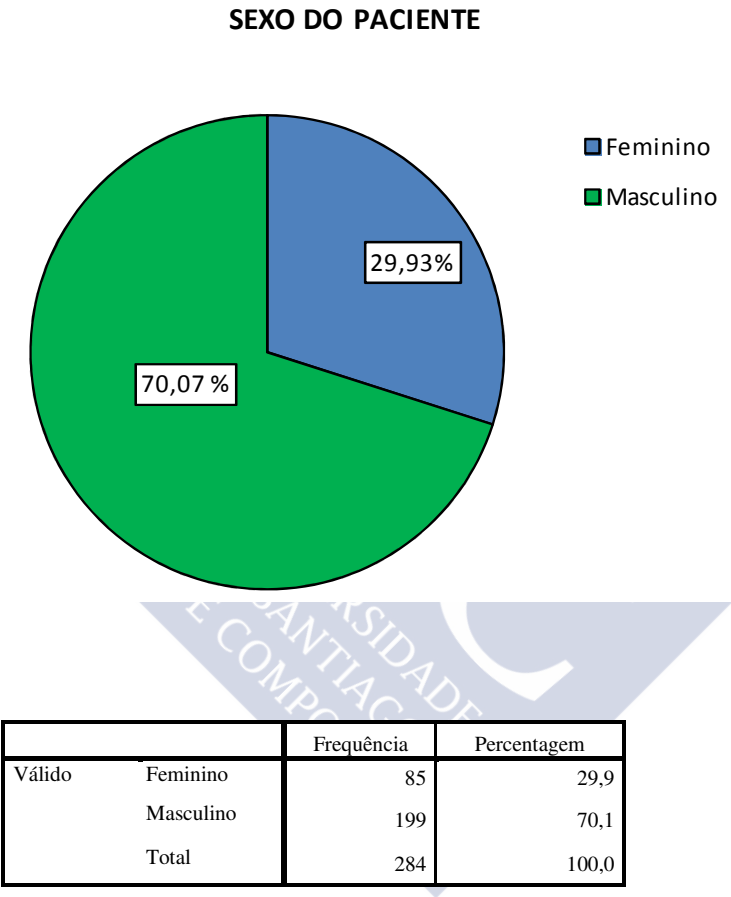


Figura 16 - Distribuição da população estudada por género

A idade média à data do diagnóstico foi de 52,31 anos (com idade mínima de 6 e máxima de 84 anos) (figura 17).

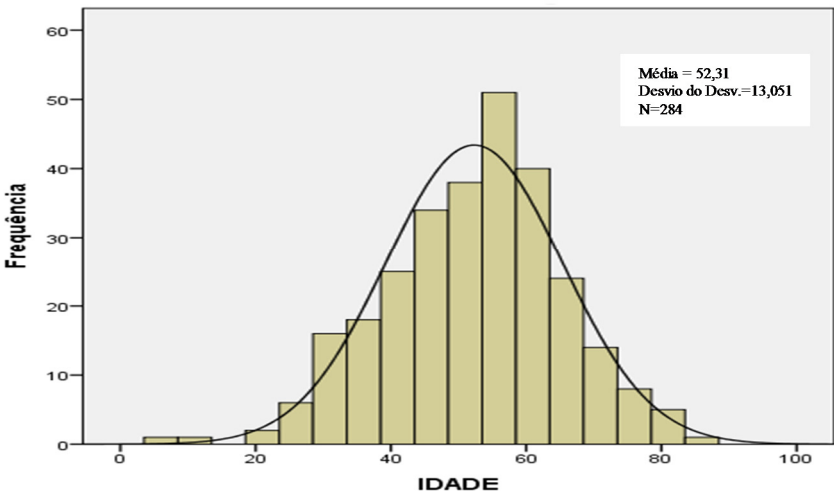


Figura 17 - Distribuição da população estudada por idade

Quando comparamos a distribuição dos doentes em função da idade e do género, encontramos, além do predomínio do sexo masculino uma tendência para que o número de casos estudados nas mulheres seja sobretudo depois da idade da menopausa (45-50 anos) (figura 18).

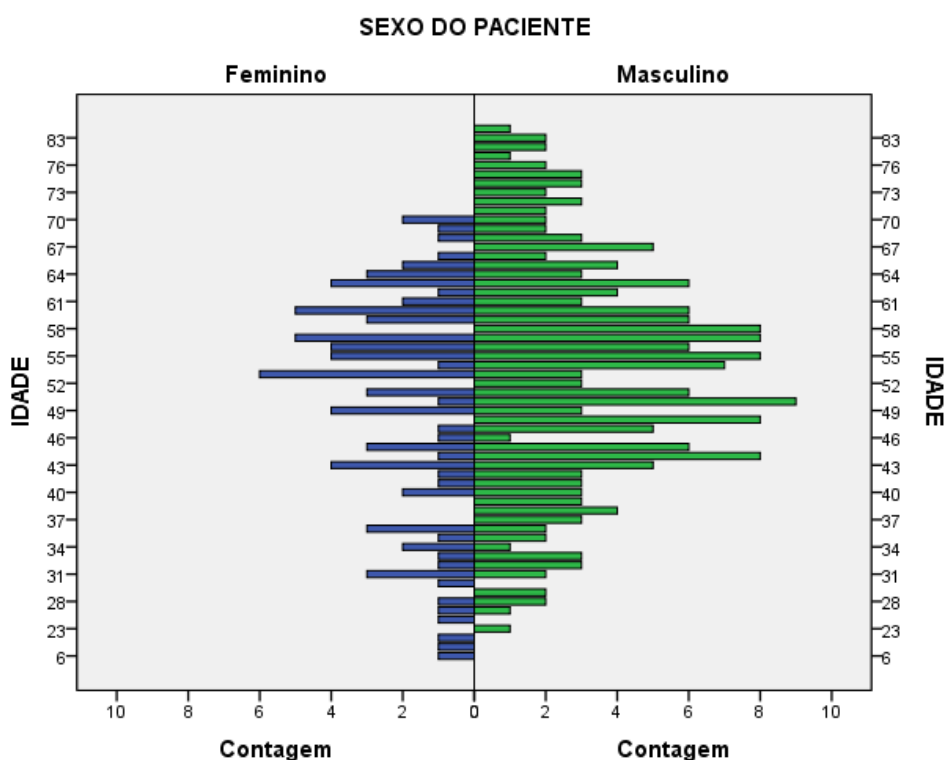


Figura 18 - Distribuição da população estudada por idade e género

4.1.2. Distribuição por Índice de Massa Corporal

Dos 284 casos de doentes incluídos na amostra, podemos verificar que, em termos médios, estes se encontram muito próximos do valor mínimo para serem considerados obesos ($IMC \geq 30$), pois obtivemos como resultado uma média de $IMC = 28,55$ com um Desv. Padrão = 4,922 (figura 19).

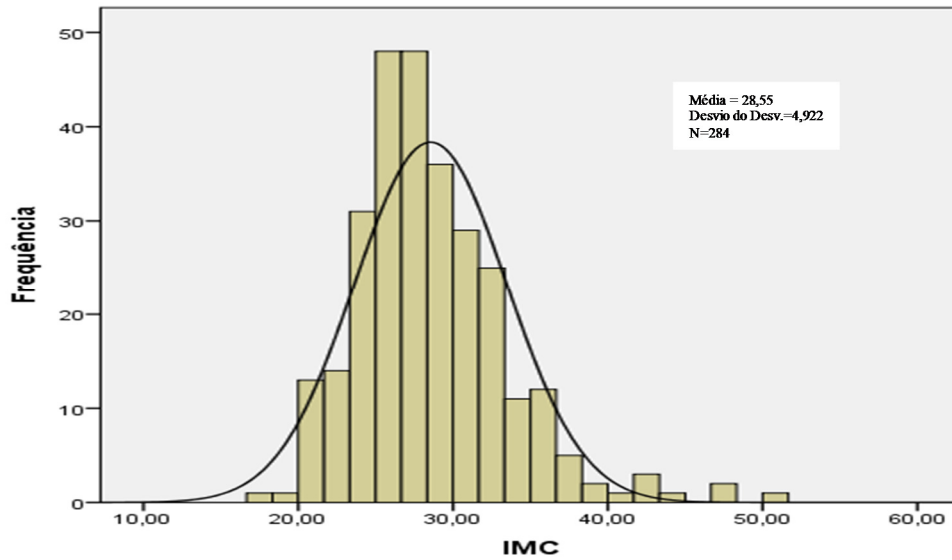


Figura 19 - Distribuição da população estudada por índice de massa corporal

O índice de massa corporal foi calculado com base na fórmula: $IMC = \text{peso(Kg)} / \text{quadrado da altura (m)}$. Do mesmo modo comparamos a distribuição do índice de massa corporal por género nos pacientes estudados, constatando-se um maior IMC no género masculino (figura 20).

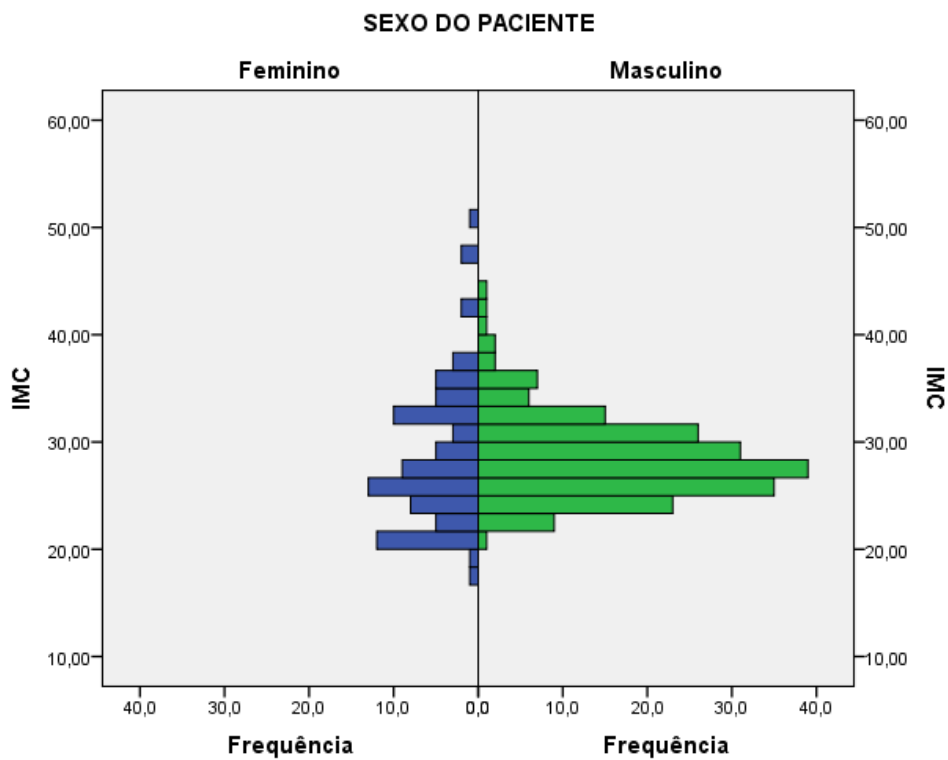


Figura 20 - Distribuição da população estudada por índice de massa corporal e género.

4.1.3. História Familiar

Quando questionados sobre a existência de história familiar de Patologias de Sono, a esmagadora maioria referiu a não existência de membros da família com este tipo de patologias (figura 21).

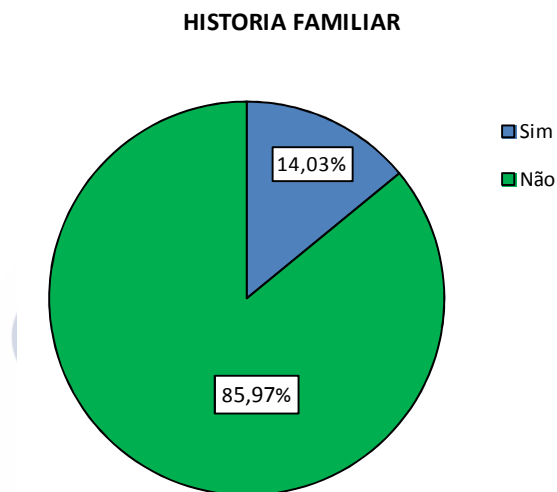


Figura 21 - Distribuição da população estudada com história familiar para patologias do sono

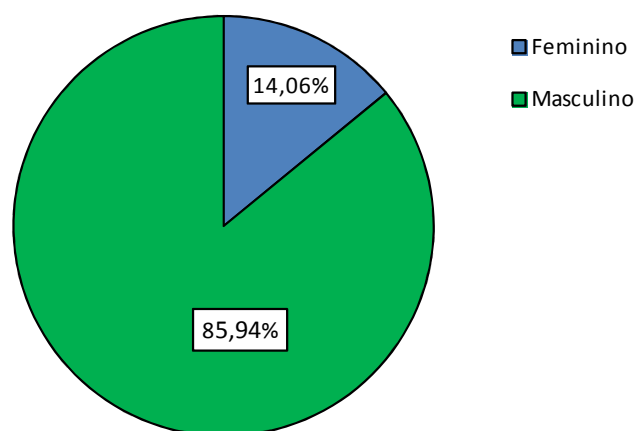
Feita esta caracterização da população geral, passamos agora a analisar a população com SAOS.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS DOENTES COM SAOS

4.2.1. Distribuição por Sexo e Idade

Dos doentes com SAOS incluídos na amostra, 85,94% eram do sexo masculino e 14,06% do sexo feminino, o que corresponde a uma proporção de aproximadamente 6:1 (figura 22A). Conforme referido na literatura, após a menopausa (consideramos esta como ocorrendo na mulher depois dos 45 anos) observa-se um aumento da frequência de SAOS nas mulheres. A distribuição por género dos doentes com mais de 45 anos na nossa população segue uma proporção idêntica à anterior (predomínio do sexo masculino). (figura 22B).

SEXO DO PACIENTE



		Frequência	Percentagem
Válido	Feminino	18	14,1
	Masculino	110	85,9
	Total	128	100,0

Figura 22A - Distribuição dos doentes com SAOS por género

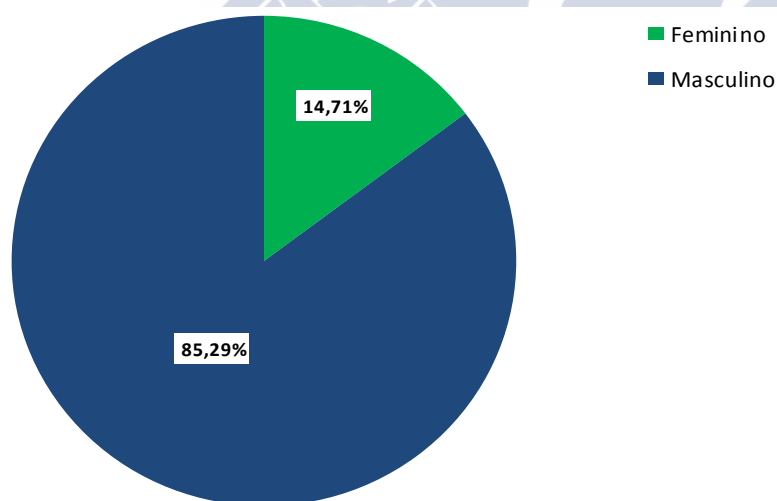


Figura 22B - Distribuição dos doentes com SAOS por género após os 45 anos

A idade média à data do diagnóstico para este grupo de doentes com SAOS foi de 54,49 anos (com idade mínima de 26 e máxima de 84 anos) (figura 23)

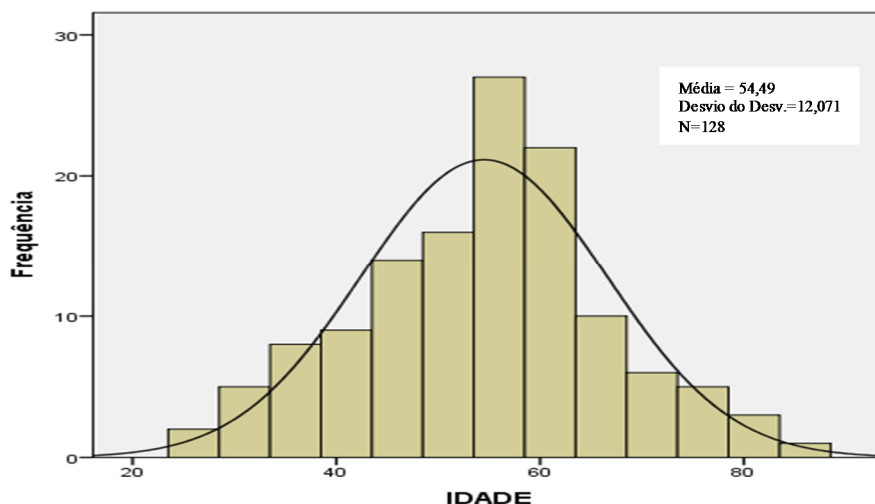


Figura 23 - Distribuição dos doentes com SAOS por idade

4.2.2. Distribuição por Índice de Massa Corporal

Dos 128 casos de doentes incluídos neste subgrupo de amostra (doentes com SAOS), podemos verificar que estes se encontram ainda mais próximos do valor mínimo para serem considerados obesos ($\text{IMC} \geq 30$), pois obtivemos como resultado uma média de $\text{IMC} = 29,33$ com um Desv. Padrão = 4,698. (figura 24)

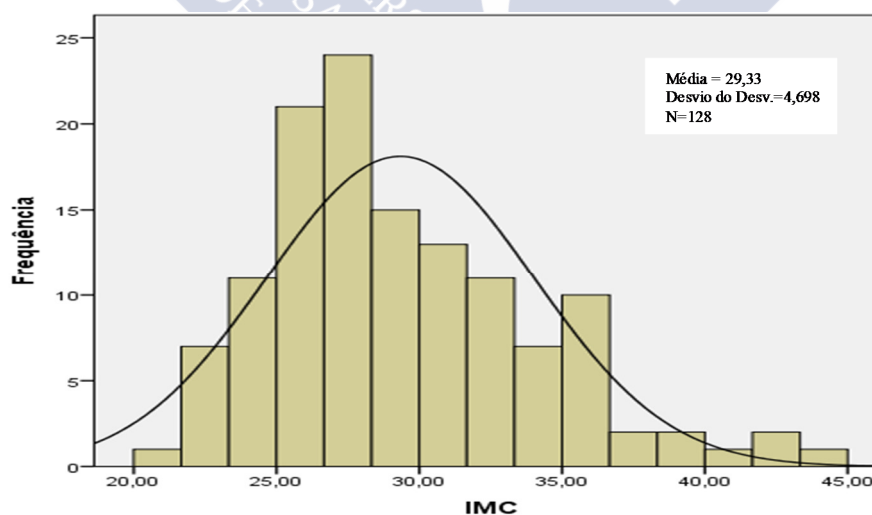


Figura 24 - Distribuição dos doentes com SAOS por Índice de Massa Corporal

4.2.3. Hábitos de Sono (número de horas de sono por dia)

Ao analisarmos os hábitos de sono deste grupo constatamos que em média tinham um número horas de sono por dia suficiente. O resultado obtido apresentou uma média de 6,9 horas/dia com um Desv. Padrão = 1,479 (figura 25).

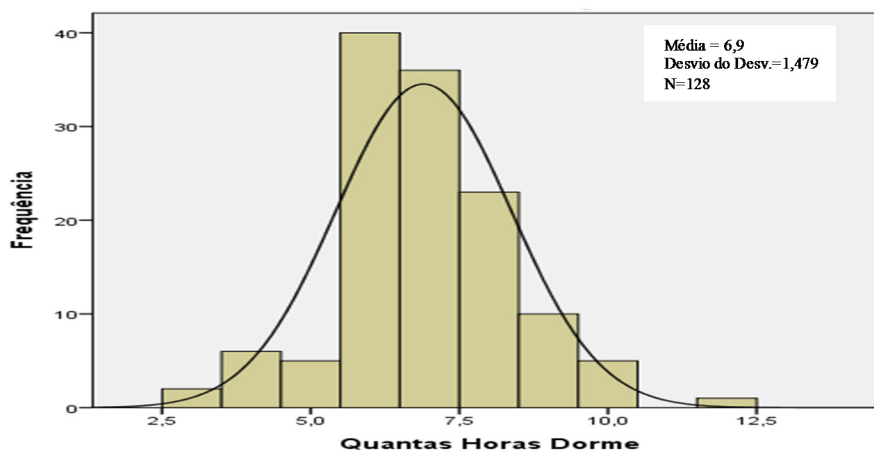


Figura 25 - Distribuição dos doentes com SAOS por horas de sono

4.2.4. História Familiar

Quando questionados sobre a existência de história familiar de SAOS, e à semelhança do que tinha acontecido com o total de doentes estudados a grande maioria (83,2%) referiu a não existência de membros da família com este tipo de patologia (figura 26).

HISTORIA FAMILIAR

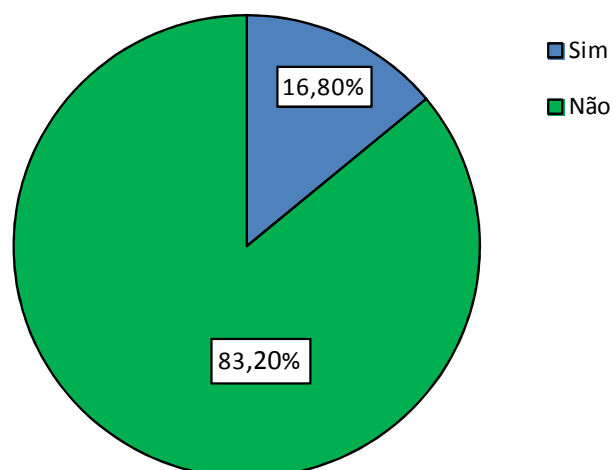


Figura 26 - Distribuição dos doentes com SAOS e história familiar da doença

4.2.5. Correção Ortodôntica

Questionamos os doentes com SAOS sobre o facto de terem efetuado correção ortodôntica e com isso terem de alguma forma alterado a sua estrutura craneofacial. Verificamos que cerca de 90% dos doentes, nunca tinham efetuado tal tratamento (figura 27).

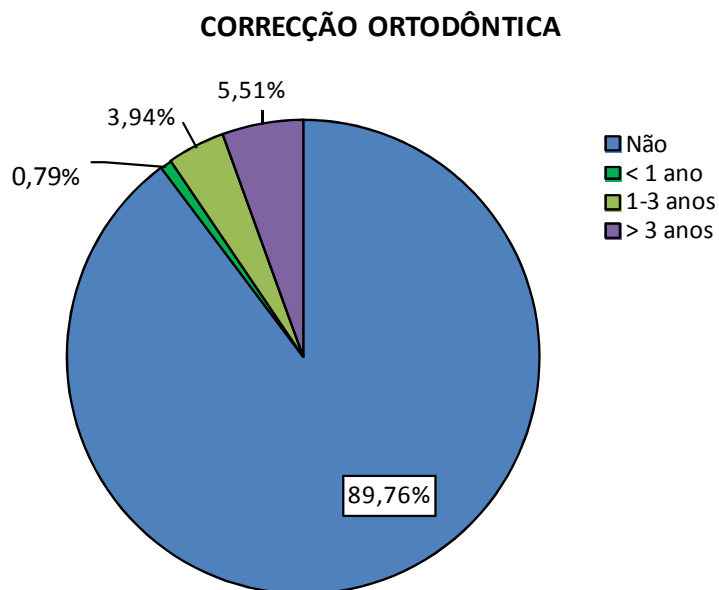


Figura 27 - Distribuição dos doentes com SAOS que foram submetidos a tratamento ortodôntico

4.2.6. Cirurgia às Amígdalas

Quanto ao facto de terem efetuado em algum momento das suas vidas cirurgia às amígdalas e terem alterado a composição dos tecidos moles, também aqui o valor negativo foi extremamente elevado, situando-se em cerca de 85% (figura 28).

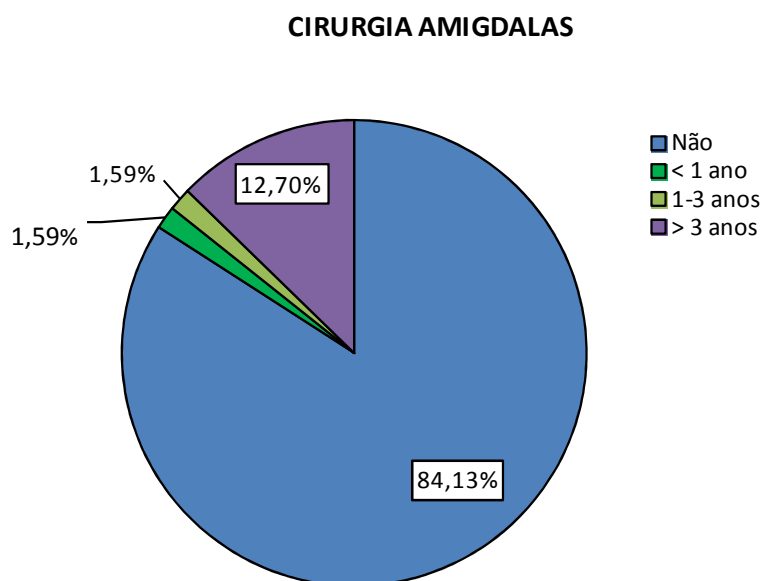


Figura 28 - Distribuição dos doentes com SAOS que foram submetidos a cirurgia às amígdalas.

4.3. SAOS E COMORBILIDADES

Como atrás referimos, vários estudos epidemiológicos indicam associações entre SAOS e doenças, mais frequentemente as integradas na síndrome metabólico. Essa associação ocorre quer com os diversos (obesidade, diabetes, hipertensão arterial, entre outros) associados, na totalidade, parcialmente, ou individualmente (Netze, 1999; Gasa, 2011). Estes componentes atuam como fatores de risco na mortalidade e na morbilidade da SAOS (Hiestand, 2006; Gasa, 2011).

Neste contexto analisamos a presença de comorbilidades na coorte de SAOS estudada (128 doentes) usando sempre a mesma metodologia de identificação dos doentes, em função da gravidade da apneia. A gravidade da apneia definiu-se em função do número de Apneias/Hipopneias ou índice IAH/Hora de sono. De acordo com ICSD 3 as apneias consideradas ligeiras se ≥ 5 IAH < 15 , de média gravidade se ≥ 15 IAH < 30 e graves se IAH ≥ 30 .

Os resultados da distribuição da população de SAOS em função da gravidade da apneia estão expressos na parte superior do Quadro 1. Na parte inferior deste Quadro referem-se as características dos 96 pacientes com SAOS que apresentam comorbilidades. Estas comorbilidades distribuem-se de modo semelhante, quanto à gravidade, ao da população geral

com SAOS, com a maioria dos doentes distribuídos pelos subgrupos de apneia de gravidade média ou ligeira.



	Gravidade da Apnea			SAOS (Total)
	Ligeira	Moderada	Grave	
	(IAH 5-15)	(IAH 15-30)	(IAH >30)	
Doentes com SAOS [n (%)]				
Total	59 (46%)	30 (23%)	39 (31%)	128
Homens	47 (42%)	29 (26%)	35 (32%)	111 (87%)
Mulheres	12 (71%)	1 (5%)	4 (24%)	17 (13%)
Média de Idades (anos) de doentes com SAOS [\bar{x}]				
Total	54.1	53.8	56.1	54.6
Homens	53.1	53.9	56.8	54.5
Mulheres	57.8	51	49.5	55.5
Doentes com SAOS com CoM [n (%)]				
Total	43 (45%)	22 (23%)	31 (32%)	96
Homens	31 (39%)	21 (26%)	28 (35%)	80 (83%)
Mulheres	12 (75%)	1 (6%)	3 (19%)	16 (17%)
Média de Idades (anos) de doentes com SAOS com CoM [\bar{x}]				
Total	55.8	54.3	57.1	55.9
Homens	55	54.4	58.3	56
Mulheres	57.8	51	46	55.2

Quadro 1 - Distribuição dos doentes com SAOS (IAH>5) e com comorbilidades (CoM) em função da gravidade da SAOS.

Analisando a distribuição de comorbilidades em função da SAOS encontramos comorbilidades em 75% dos doentes e em função da gravidade em 72.8%, 73% e 79%, nos doentes respetivamente com SAOS ligeira, moderada e grave. No entanto, não se encontram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes subgrupos ($p=0.739$) (Quadro 2).

Nos doentes sem patologias respiratórias encontramos comorbilidades em 61% dos doentes (Quadro 2).

Comorbilidades	Pacientes com SAOS				Sem Alterações Respiratórias
	L	M	G	Total SAOS	
Presença	43 (72.8%)	22 (73.3%)	31 (79.5%)	96 (75%)	67 (61%)
Ausência	16 (27.2%)	8 (26.7%)	8 (20.5%)	32 (25%)	43 (39%)
Total	59	30	39	128	110

Quadro 2 - Presença/Ausência de comorbilidades em doentes com SAOS e com patologias de sono não respiratórias

Analisando a distribuição individual das comorbilidades presentes nos doentes com SAOS, encontramos a obesidade como a mais frequente seguida da hipertensão arterial (HTA), diabetes, outras patologias cardiovasculares, doenças psiquiátricas, neurológicas e cancro entre outros (Quadro 3). No subgrupo classificado como vários incluem-se diferentes patologias, como doenças digestivas ou doentes submetidos a transplantes. O número total de comorbilidades é superior ao número de doentes porque alguns dos doentes têm mais do que uma comorbilidade.

Considerando os subgrupos de doentes em função da gravidade da SAOS e a distribuição de comorbilidades observa-se que a obesidade é a componente mais significativa, estando presente em 84% (26/31) dos pacientes com apneia grave, sendo a distribuição semelhante para as apneias ligeira e moderada (respetivamente 44 e 45%) (Quadro 3). O cancro é uma comorbilidade apenas presente nos subgrupos de IAH ligeiro ou moderado.

Comorbilidades	SAOS			
	Ligeiro (n=43)	Moderado (n=22)	Grave (n=31)	Total (n=96)
Obesidade (IMC>30)	19 (44%)	9 (45%)	26 (84%)	54 (56%)
HTA	17 (39%)	7 (32%)	10 (32%)	34 (35%)
Diabetes	8 (18%)	4 (18%)	5 (16%)	17 (18%)
Doença Vascular e Cardiovascular	9 (21%)	1 (5%)	5 (16%)	15 (16%)
Alterações Psiquiátricas	6	2	1	9
Alterações Musculo-Esqueléticas	4	3	2	9
Alterações Neurológicas	4	2	2	8
Cancro	3	5	-	8
Alterações de Ouvido, Nariz e garganta e outras alterações das vias aéreas superiores	4	2	2	8
Patologia Sanguínea	3	3	-	6
Outros	4	2	2	8

Quadro 3 - Doentes com SAOS, com comorbilidades específicas

A associação entre o número de comorbilidades e a gravidade da SAOS está descrita no quadro seguinte (Quadro 4). Quarenta e cinco doentes apresentam apenas uma comorbilidade (47% do total de doentes com SAOS e com comorbilidades). A obesidade é a comorbilidade mais comum (44,4%), sobretudo no subgrupo de SAOS grave (71%).

Cinquenta e três por cento dos doentes apresentam várias comorbilidades. Sendo a obesidade uma das mais comuns, a outra é a HTA.

Embora a ocorrência de comorbilidades seja maior no grupo com apneia ligeira ou moderada em relação à apneia grave as diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0.405$).

Co- morbilidades	Ligeira (n=43)	Moderada (n=22)	Grave (n=31)	SAOS (n=96)
Apenas 1 co-morbilidade	17 (38%)	11 (24%)	17 (38%)	45 (47%)
Obesidade	5/17 (29%)	3/11 (27%)	12/17 (71%)	20/45 (44.4%)
Múltiplas comorbilidades	26 (51%)	11 (22%)	14 (27%)	51 (53%)
Obesidade + HTA + outra	5/26 (19%)	5/11 (46%)	8/14 (57%)	18/51 (35%)
(Obesidade + HTA)	-	-	4/8 (50%)	4/18 (22.2%)
Obesidade + outra (não HTA)	9/26 (35%)	1/11 (9%)	6/14 (43%)	16/51 (31%)
HTA + outra (não obesidade)	11/26 (38%)	2/11 (18%)	-	13/51 (24%)
Outras (não HTA nem Obesidade)	1/26 (8%)	3/11 (27%)	-	4/51 (10%)

Quadro 4: Presença de uma ou mais comorbilidades e a mais comum de cada

Fizemos o mesmo tipo de análise de distribuição das comorbilidades para os doentes registados e sem alterações respiratórias ($n=67$). Como se pode observar no Quadro 5 as comorbilidades encontradas nos doentes sem alterações respiratórias foram semelhantes às encontradas para o grupo de doentes com SAOS. No entanto a ordenação da frequência é diferente dado que as doenças cardiovasculares e a Hipertensão surgem como as mais frequentes aparecendo a obesidade em terceiro lugar.

Calculando as diferenças entre os 2 grupos de doentes (com SAOS ou sem alterações respiratórias) estas indicam que as comorbilidades estão mais frequentemente relacionadas com a SAOS ($p=0.0196$).

Comorbilidades	Sem Alterações Respiratórias (n=67)
Obesidade (IMC>30)	12 (18%)
HTA	15 (22%)
Diabetes	7 (10%)
Doença Vascular e Cardiovascular	16 (24%)
Alterações Psiquiátricas	8 (12%)
Alterações Musculo-Esqueléticas	10 (15%)
Alterações Neurológicas	5 (7,5%)
Cancro	7 (10%)
Alterações de Ouvido, Nariz e garganta e outras alterações das vias aéreas superiores	6 (9%)
Patologia Sanguínea	4 (6%)
Outros	11 (16,5%)

Quadro 5 - Número de pacientes com distúrbios de sono não respiratórios e com comorbilidades específicas.

4.4. ESTUDOS GENÉTICOS

4.4.1. Informação dos Genes

Do levantamento bibliográfico efetuado com base nos fenótipos associados à Obesidade, à Estrutura dos Tecidos Moles, à Estrutura Craniofacial e a Outros Genes foram selecionados 34 genes que distribuímos por 4 grupos (figura 36). Destes genes, com exceção dos genes do sistema HLA, identificamos um painel de 88 polimorfismos de base única (SNPs), distribuídos da seguinte forma: 22 faziam parte do grupo dos genes da obesidade – genes MC4R, FTO, LEP, LEPR, APM1, ADIPOR1, ADIPOR2, PPARG2, PPARGC1A, PAI1 e ACE; 27 pertenciam ao grupo dos genes do desenvolvimento da estrutura craniofacial – genes TGFB1, TGFB1R, TGFB2, EDN1, FGF2, FGFR2, OPG, RANK, RANKLr; 16 estavam relacionados com as características do desenvolvimento dos tecidos moles – genes GDF8, CKMM, IGF1, IGF1R, IGFBP31; e 23 polimorfismos integraram o grupo de outros genes possivelmente associados à SAOS – genes CAPN10, GABBR1, GNAS, MMP1, MYH6, MYH7, PON1, APOE e HLA.

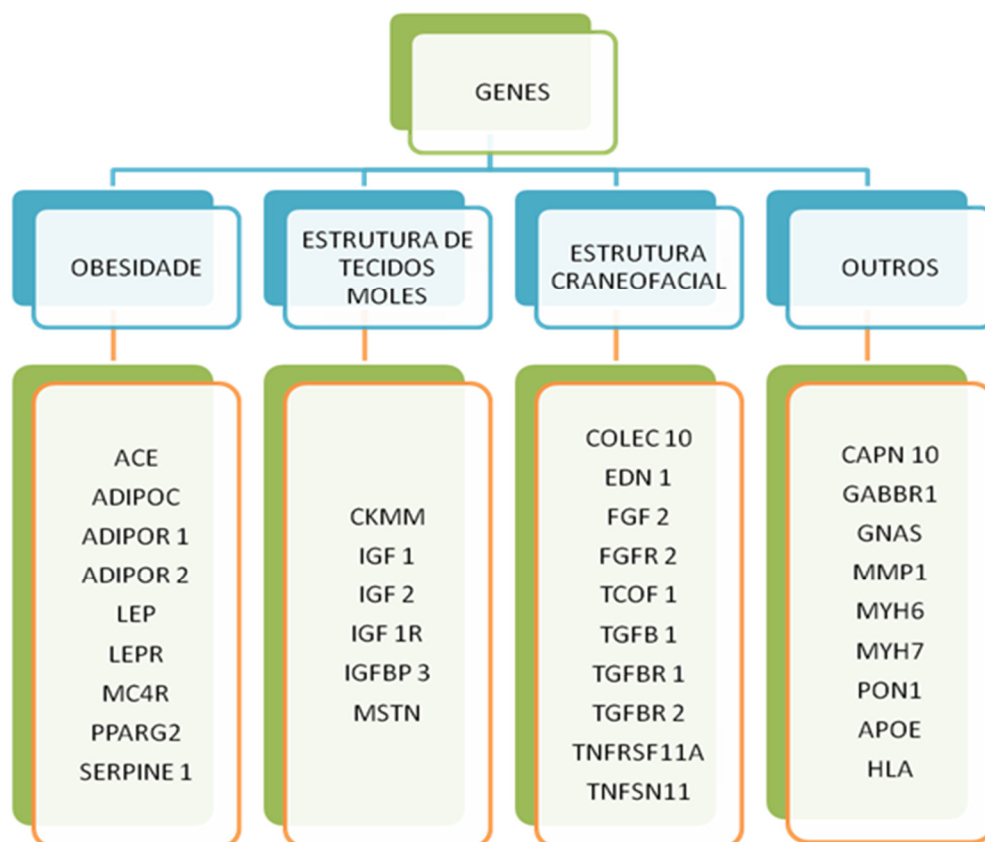


Figura 29 - Divisão dos genes em 4 grupos: genes associados à Obesidade, à Estrutura dos Tecidos Moles, à Estrutura Craniofacial e a outros genes.

4.4.2. Estudo dos polimorfismos genéticos (SNP(s)) relacionados com a obesidade, estrutura craniofacial, tecidos moles e outros na suscetibilidade à SAOS

Na análise dos parâmetros genéticos e como referido anteriormente, não comparámos apenas o SAOS com as Outras Patologias mas também com a população controlo.

Os polimorfismos foram genotipados na plataforma Sequenom.

Os genótipos foram inferidos pela comparação das massas dos picos obtidos com a massa dos produtos de extensão esperados.

Dos 88 SNP(s) analisados, 81 foram considerados e 7 rejeitados. Após a visualização dos valores obtidos no SNP(s) Genotyping, e posterior consulta da parte gráfica (histograma e cluster plot) conseguimos resgatar alguns dos SNP(s) que inicialmente deram alguns valores desconfortáveis, eliminando assim numa fase inicial apenas o SNP rs4291 do gene ACE devido ao facto deste ser não polimórfico.

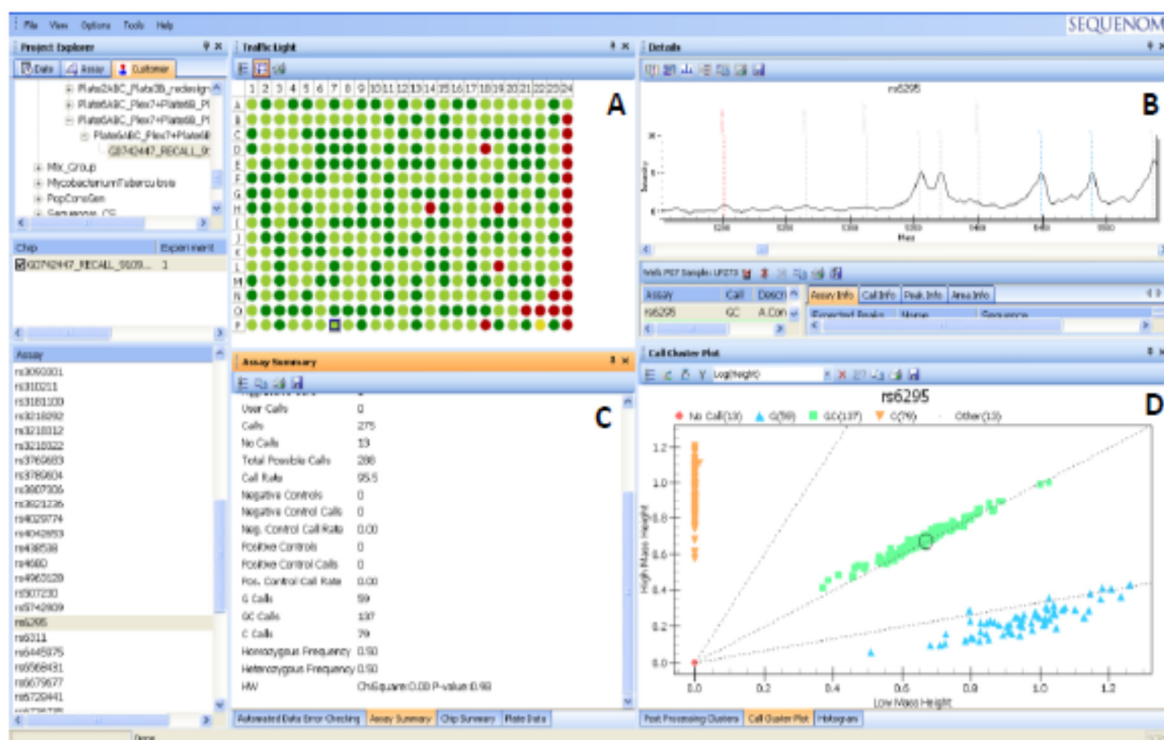


Figura 30 - A - Localização da amostra no chip; B - Espetro onde são detetados os produtos de extensão alélica, diferenciados pela massa; C - Verificação se a distribuição de cada SPN está em equilíbrio de Hardy - Weinberg; D - Distribuição genotípica das amostras em estudo onde (amarelo) representa indivíduos homozigóticos (CC), (verde) heterozigóticos CG e (azul) homozigóticos para GG, para cada um dos SNP(s) testados.

Depois de uma primeira abordagem os dados foram analisados no Haploview (Figura 31), onde verificamos que dos 88 SNP(s) selecionados 6 não se encontravam em equilíbrio de HWE sendo 4 do gene APOE referente ao grupo de outros genes associados, 1 referente ao gene CKMM e por fim 1 referente ao gene IGFBP3, pertencendo ambos ao grupo de genes associados à estrutura dos tecidos moles.

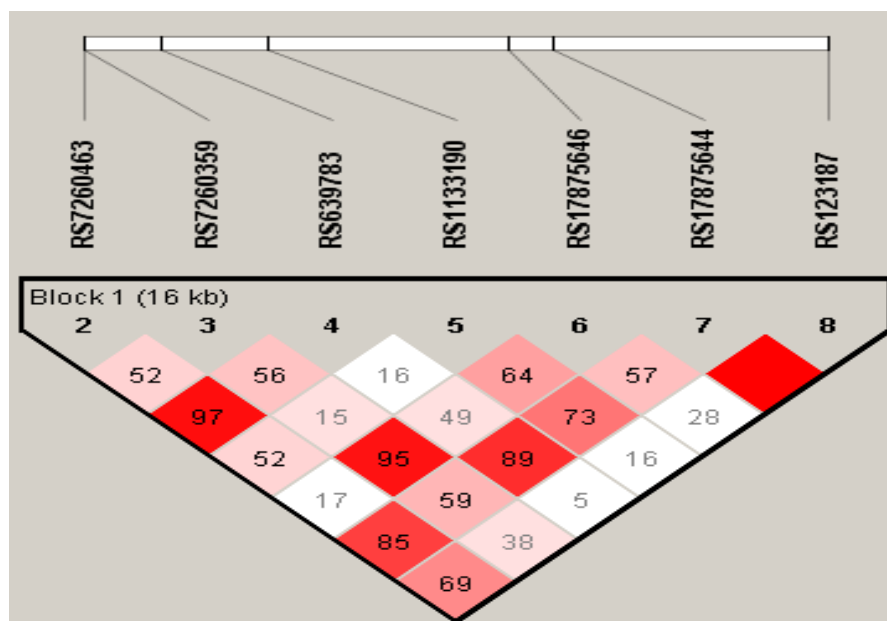


Figura 31: Visualização através do Haploview das associações ao nível do cromossoma 19.

Também o SNP rs1449683 do gene FGF2 da estrutura craniofacial foi eliminado não pelo facto de estar em desequilíbrio de Hardy-Weinberg mas pelo facto da percentagem de genotipagem ter sido baixa (18%).

Só foram considerados para estudo os polimorfismos cujas frequências não se desviavam significativamente do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ficamos assim com um conjunto de genes e SNP(s) enunciados nos Anexos.

Após as análises efetuadas utilizando os *softwares* SPSS, SNPATOR, HAPLOVIEW e FuncPred os resultados foram analisados no contexto das associações anteriormente sugeridas (obesidade, tecidos moles, estrutura craneofacial e outros genes associados). As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, foram comparadas entre cada um dos subgrupos das populações em estudo (SAOS, Outras Patologias e População Controlo).

4.4.2.1. Genes Associados à Obesidade

4.4.2.1.1. Alelos

Considerando a frequência alélica, observamos diferenças significativas para o alelo G do rs2227674 ($p=0.0240$), do gene SERPINE1, no caso da comparação entre os subgrupos Outras Patologias vs. População Controlo, presumindo-se que este SNP representa um risco aumentando para a presença da obesidade no subgrupo outras patologias. (Quadro 6).

	SNP	P	Major	Validity	Odds Ratio	CI 95
OUTRAS PATOLOGIAS VS POPULAÇÃO CONTROLO	rs2227674	0.0240*	G	Y	1.4487	1.05 - 2.00

Quadro 6: Análise alélica nos Genes associados à Obesidade analisados em dois dos três grupos de populações estudadas.

4.4.2.1.2. Genótipos

Conforme podemos observar no Quadro 7 e no caso da comparação entre Outras Patologias vs. População Controlo observamos diferenças significativas para o genótipo GA do rs1137101, do gene LEPR, com um valor de $p=0.013$ indicando que este SNP tem um papel protetor para as Outras Patologias. Verificamos ainda diferenças significativas para o genótipo GA do rs2227674, do gene SERPINE1, com um valor de $p=0.010$ indicando que a presença deste SNP é um fator de risco também para as Outras patologias de Sono.

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
OUTRA PATOLOGIA VS POPULAÇÃO CONTROLO	Step 15 ^a			6,349	2	,042			
	RS1137101			6,130	1	,013	,547	,339	,882
	RS1137101(1)	-,604	,244	,399	1	,527	,813	,428	1,546
	RS1137101(2)	-,207	,328	7,530	2	,023			
	RS2227674	,654	,254	6,641	1	,010	1,924	1,170	3,164
	RS2227674(1)	,936	,586	2,550	1	,110	2,549	,808	8,039

Quadro 7: Regressão logística de SNP's da obesidade nos três grupos populacionais. RS1137101 (1) - indica a presença do genótipo GA, RS1137101 (2) - indica a presença do genótipo GG, RS2227674 (1) indica a presença do genótipo GA e RS2227674 (2) indica a presença do genótipo GG

4.4.2.1.3. Haplótipos

Na análise dos haplótipos deste subgrupo não foram encontradas associações estatisticamente significativas.

4.4.2.2. Genes Associados aos Tecidos Moles

4.4.2.2.1. Alelos

Utilizando os mesmos procedimentos, não verificamos qualquer tipo de resultados estatisticamente significativos para as associações alélicas nos genes associados aos tecidos moles.

4.4.2.2.2. Genótipos

Utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita não verificamos qualquer tipo de resultados estatisticamente significativos.

4.4.2.2.3. Haplótipos

No que diz respeito à análise haplotípica dos genes CKM do cromossoma 19, do grupo dos tecidos moles, encontramos um conjunto de haplótipos (G-T-A-C-T-A-A, $p < 0.01$, T-C-G-C-C-G-G < 0.01 , G-T-G-C-C-G-A < 0.01 , G-T-G-T-C-G-A $= 0.0007$ e T-T-G-C-C-G-G $p = 0.0120$) que apresentam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de população com SAOS e a população controlo, mostrando a importância destes haplótipos numa associação com a doença.

Quando a comparação foi efetuada entre o grupo de população com SAOS e outras patologias, também observamos diferenças estatisticamente significativas num conjunto de haplótipos (T-T-G-C-C-G-G $p < 0.01$, G-T-A-C-T-A-A $p < 0.01$, G-T-G-C-C-G-A $p = 0.0002$, G-T-G-T-C-G-A $p = 0.0003$ e T-C-G-C-C-G-G $p = 0.0006$) para os mesmos genes CKM do cromossoma 19, mostrando a importância deste haplótipo numa associação com a doença.

4.4.2.3. Genes Associados à Estrutura Craneofacial

4.4.2.3.1. Alelos

Verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas para o alelo C do rs2981575, do gene FGFR2, no caso da comparação entre SAOS vs. População Controlo com um $p = 0.0341$ e no caso da comparação entre SAOS vs. Outras Patologias também para o mesmo alelo C com um $p = 0.0342$, presumindo-se assim que este SNP, em ambos os casos, representa um risco aumentando para a presença de alterações da estrutura craneofacial. (Quadro 8).

	SNP	P	Major	Validity	Odds Ratio	CI 95
SAOS VS POPULAÇÃO CONTROLO	rs2981575	0.0341*	C	Y	1.3919	1.02 - 1.89
SAOS VS OUTRAS PATOLOGIAS	rs2981575	0.0342*	C	Y	1.4591	1.03 - 2.07

Quadro 8: Análise alélica nos Genes associados à Estrutura Craneofacial analisados nos três grupos de populações estudadas.

4.4.2.3.2. Genótipos

Conforme podemos observar no Quadro 9 a comparação entre SAOS vs. População Controlo permite-nos observar diferenças significativas para os genótipos TC e TT do rs2981575, do gene FGFR2, com valores de $p=0.09$ e de $p=0.33$ respetivamente e para o genótipo CC do rs4803455, do gene TGFB1, ambos funcionando como genótipos protetores.

No caso da comparação entre Outras Patologias vs. População Controlo observamos diferenças significativas para o genótipo TC do rs2981575 com um valor de $p=0.009$ e para o genótipo CC do rs4803455 com um valor de $p=0.025$, indicando também serem genótipos protetores.

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
SAOS VS POPULAÇÃO CONTROLO	Step 20 ^a	RS2981575		7,008	2	,030			
		RS2981575(1)	-,897	,346	6,744	1	,009	,408	,207
		RS2981575(2)	-,781	,366	4,556	1	,033	,458	,223
		RS4803455		8,720	2	,013			
		RS4803455(1)	-,629	,331	3,621	1	,057	,533	,279
		RS4803455(2)	-,122	,380	8,718	1	,003	,326	,155
OUTRAS PATOLOGIAS VS POPULAÇÃO CONTROLO	Step 18 ^a	RS2981575		6,821	2	,033			
		RS2981575(1)	-,863	,351	6,047	1	,014	,422	,212
		RS2981575(2)	-,397	,362	1,203	1	,273	,672	,331
		RS4803455		5,187	2	,075			
		RS4803455(1)	-,612	,339	3,258	1	,071	,542	,279
		RS4803455(2)	-,816	,364	5,038	1	,025	,442	,217

Quadro 9: Regressão logística de SNP's da estrutura craneofacial nos três grupos populacionais. RS2981575 (1) - indica a presença do genótipo TC, RS2981575 (2) - indica a presença do genótipo TT, RS4803455 (1) indica a presença do genótipo CA e RS4803455 (2) indica a presença do genótipo CC

4.4.2.3.3. Haplótipos

No que diz respeito à análise haplotípica, relativamente ao gene TGFB1 do cromossoma 19 (Figura 31), do grupo da estrutura craneofacial, verificamos que para o haplótipo C-C-A-G $p=0.0030$, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo SAOS e controlo, mostrando a importância da associação deste haplótipo com a doença.

4.4.2.4. Outros Genes estudados

4.4.2.4.1. Alelos

Verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas para o alelo G do rs705382, do gene PON1, no caso da comparação entre SAOS vs. População Controle com um $p=0.0018$ no caso da comparação entre Outras Patologias vs. População Controle para o alelo C do mesmo rs705382 com um $p=0.0111$. Verificamos ainda nesta comparação (Outras Patologias vs. População Controle) a existência de mais um alelo C, neste caso do rs6123832 com um valor de $p=0.0107$, ou seja estatisticamente significativo, todos apresentando um risco aumentado (Quadro 10).

	SNP	P	Major	Validity	Odds Ratio	CI 95
SAOS VS OUTRAS PATOLOGIAS	rs705382	0.0018**	G	Y	1.7681	1.23 - 2.53
OUTRAS PATOLOGIAS VS POPULAÇÃO CONTROLO	rs6123832	0.0107*	C	Y	1.4392	1.09 - 1.90
	rs705382	0.0111*	C	Y	1.4578	1.09 - 1.95

Quadro 10: Análise alélica nos Outros Genes analisados nos três grupos de populações estudadas.

4.4.2.4.2. Genótipos

A comparação entre Outras Patologias vs. População Controle (Quadro 11) permitiu-nos observar diferenças significativas para os genótipos CG e CC do rs705382, do gene PON1 com valores de $p=0.001$. Em ambos os casos, a presença deste genótipo significa um risco aumentado para a doença. No mesmo subgrupo de doentes os genótipos CT e CC do rs854573, do gene PON1, apresentam também valores estatisticamente significativos de p , 0.030 e 0.005 respetivamente, funcionando como genótipos protetores para a doença.

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
OUTRA PATOLOGIA VS POPULAÇÃO CONTROLO	Step 15a	RS854573		9,532	2	,009			
		RS854573(1)	-,748	,345	4,708	1	,030	,473	,241
		RS854573(2)	-1,949	,693	7,914	1	,005	,142	,037
		RS705382		14,858	2	,001			
		RS705382(1)	1,141	,345	10,935	1	,001	3,130	1,592
		RS705382(2)	1,679	,492	11,664	1	,001	5,359	2,045

Quadro 11: Regressão logística de SNP's dos Outros Genes estudados nos três grupos populacionais. RS705382 (1) - indica a presença do genótipo CG, RS705382 (2) - indica a presença do genótipo CC, RS854573 (1) indica a presença do genótipo CT e RS854573 (2) indica a presença do genótipo CC.

4.4.2.4.3. Haplótipos

No que diz respeito ao gene PON1, pertencente ao grupo dos Outros Genes, foram observadas diferenças significativas para o haplótipo A-C $p=0.0038$, entre o grupo SAOS e o das outras patologias, mostrando a importância deste haplótipo numa associação com a doença.

Considerando ainda o gene PON1 encontramos diferenças estatisticamente significativas para o haplótipo A-C $p=0.0234$ entre o grupo outras patologias e a população controlo.

4.4.2.5. Análise no FuncPred

Da análise efetuada *in silico* utilizando o programa FuncPred observamos que o SNP rs705382, do gene PON1, pode levar a uma alteração no local de ligação de um fator de transcrição, o mesmo se passa em relação ao rs854573, do gene PON1. Relativamente ao rs1137101, do gene LEPR, verificamos que este SNP pode levar à alteração de um local de splicing.

4.4.3. Estudos de HLA

4.4.3.1. SAOS e HLA-DR3

Os estudos de associação entre os genes do Complexo Maior de Compatibilidade ou HLA e o SAOS têm sido diversos e com conclusões também diversas. No entanto, tem vindo a ser descrita, com consistência, a associação entre SAOS e certos *loci* do complexo HLA. Investigamos nos nossos doentes, que tipo de associação se poderia encontrar e obtivemos resultados consistentes, com significância credível, e semelhantes aos de outras séries numa população italiana (Brunetti *et al.*, 2005).

Da coorte inicial, foram estudados 131 sujeitos que apresentavam SAOS (IAH > 5) – 114 homens e 17 mulheres. Os dados obtidos foram comparados com uma coorte de 240 doentes (139 homens e 101 mulheres) que apresentavam outras perturbações e foram considerados como pacientes sem SAOS, a saber: 58 pacientes (41 homens e 17 mulheres) apresentavam roncopia primária ou roncopia relacionada com dificuldades respiratórias com IAH < 5; e 182 pacientes com outro tipo de perturbações do sono, principalmente, com insónias, transtornos nos movimentos das extremidades, narcolepsia, hipersónia idiopática e outros tipos de hipersónias. Todos os pacientes com SAOS, exceto quatro, e 142 dos

pacientes sem SAOS tinham o IMC calculado. A população de controlo foi constituída por 223 indivíduos clinicamente saudáveis, do mesmo grupo étnico e recrutados de entre os doadores de sangue do norte de Portugal. As características demográficas dos doentes com SAOS estão expressas no Quadro 12.

	Total			Homens			Mulheres		
	<i>n</i>	%	Média	<i>n</i>	%	Média	<i>n</i>	%	Média
Número de pacientes	131	–	–	114	87,0	–	17	13,0	–
Idade (anos)	–	–	55,1	–	–	55,0	–	–	55,5
PACIENTES COM < 50 ANOS	38	29,0	40,9	34	29,8	40,6	4	23,5	43,2
PACIENTES COM ≥ 50 ANOS	93	71,0	60,9	80	70,2	61,2	13	76,5	59,2
IMC (kg/m ²)	127 ^a	–	29,4	110	–	29,4	17	–	29,9
PACIENTES COM IMC < 30	77	60,6	26,4	68	61,8	26,6	9	52,9	24,7
PACIENTES COM IMC ≥ 30	50	39,4	34,2	42	38,2	33,9	8	47,1	35,7

Quadro 12: Características demográficas dos pacientes com Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono. IMC: Índice de Massa Corporal. ^a Informação indisponível em quatro dos pacientes.

Foram recolhidas amostras de sangue venoso periférico (10 ml), em tubo em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), aos pacientes com SAOS, ao grupo com perturbações de sono e sem SAOS e aos controlos. Todos os pacientes foram informados acerca do estudo e consentiram, por escrito, que lhes fosse feito o estudo genético.

O ADN genómico foi extraído de leucócitos de sangue periférico tratados com proteinase K através da dessalinização (Miller et al, 1988). O ADN foi amplificado através PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase) para a identificação dos genes HLA- DRB1, através de métodos descritos anteriormente (Olerup e Zetterquist, 1992). Os produtos do PCR foram visualizados através de luz ultravioleta após a separação por eletroforese em gel de 1.5% de agarose com brometo de etídio. Os genótipos foram deduzidos a partir dos padrões amplificados.

A distribuição por género demonstrou que, na coorte com SAOS, a incidência foi superior para os pacientes masculinos (87% homens vs. 13% mulheres). A média de idades dos pacientes era de 55.1 anos e foram encontrados resultados similares em ambos os sexos (homens de 55 e mulheres de 55,5 anos). Como a idade de incidência mais alta ronda os 50 anos, calculámos a distribuição de pacientes com SAOS acima e abaixo dos 50 anos, a qual

resultou ser similar em ambos os sexos (homens: 29.8% < 50 anos, 70.2% ≥ 50 anos; mulheres: 23.5% < 50 anos, 76.5% ≥ 50 anos) (Quadro 12).

A fim de investigar o efeito dos determinantes genéticos do HLA na suscetibilidade à SAOS, pacientes e controlos foram genotipados para os alelos HLA-DRB1* (Quadro 13). A frequência do alelo HLA-DRB1*03 revelou-se superior na população com SAOS do que na população controlo (24% SAOS vs. 15% Pop. controlo). A diferença é estatisticamente significativa ($p = 0.024$; OR = 1.86; intervalo de confiança a 95% = 1.08-3.21). Não foram encontradas outras associações com outros alelos HLA-DRB1. Foi realizada uma regressão logística, para comprovar a independência do alelo HLA-DRB1*03 face à presença de outros alelos HLA estudados. O resultado obtido confirma a relação entre o alelo DRB1*03 e o SAOS ($p = 0.025$; OR = 1.861; intervalo de confiança a 95% = 1.081-3.205). Quando os pacientes com SAOS foram divididos em subgrupos (obesos e não obesos) não se encontraram diferenças quanto às frequências do alelo HLA entre os dois subgrupos (Quadro 13).

	Controlo (n = 223)	SAOS (n = 131) ^a		SAOS/Obeso (n = 50)	SAOS/não Obeso (n = 77)	
DRB1*01	48 (22%)	28 (21%)	0,973	15 (30%)	12 (16%)	0,075
DRB1*03	33 (15%)	32 (24%)	0,024	15 (30%)	16 (21%)	0,292
DRB1*04	52 (23%)	28 (21%)	0,673	10 (20%)	18 (23%)	0,827
DRB1*07	58 (26%)	38 (29%)	0,540	13 (26%)	25 (33%)	0,552
DRB1*08	19 (9%)	16 (12%)	0,261	4 (8%)	12 (16%)	0,278
DRB1*09	13 (6%)	2 (2%)	0,052	0	2 (3%)	0,519
DRB1*10	7 (3%)	3 (2%)	0,642	0	3 (4%)	0,278
DRB1*11	44 (20%)	30 (23%)	0,479	10 (20%)	19 (25%)	0,666
DRB1*12	8 (4%)	4 (3%)	0,789	2 (4%)	2 (3%)	0,646
DRB1*13	68 (30%)	31 (24%)	0,167	14 (28%)	16 (21%)	0,396
DRB1*14	14 (6%)	8 (6%)	0,949	4 (8%)	3 (4%)	0,432
DRB1*15	47 (21%)	21 (16%)	0,245	7 (14%)	14 (18%)	0,629
DRB1*16	9 (4%)	8 (6%)	0,379	3 (6%)	5 (7%)	1,000

Quadro 13: Frequência do alelo HLA-DRB1* nos pacientes portugueses com Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono e na população de controlo. ^a Informação do IMC indisponível em quatro dos pacientes.

Para investigar se a obesidade aumenta o risco de SAOS (ICSD3, 2014; De Sousa et al, 2008), a coorte dos pacientes foi dividida em dois subgrupos, de acordo com o IMC (< 30 ou ≥ 30), e a frequência da obesidade foi comparada com os dados publicados para a população portuguesa (do Carmo, et al., 2008). Dos 127 pacientes com SAOS, para os quais foi calculado o IMC, 39.4% eram obesos e 60.6% não obesos. A percentagem de obesidade nestes indivíduos era consideravelmente superior no grupo de pacientes com SAOS, do que a descrita para a população portuguesa em geral (39.4% vs. 14.2%; $p < 0.0001$; OR = 3.93; intervalo de confiança a 95% = 2.74-5.63). Além disso, a frequência da obesidade foi avaliada no subgrupo de 142 pessoas sem SAOS, selecionadas aleatoriamente do coorte inicial, para as quais se disponha do IMC. Neste grupo, 42 pacientes (29.6%) eram obesos (IMC > 30) e 100 não obesos. Esta diferença não é estatisticamente significativa (39.4% vs. 29.6%; $p = 0.096$). É de salientar que a percentagem de indivíduos obesos no subgrupo sem SAOS era significativamente mais alta do que a descrita para a população portuguesa em geral (29.6% vs. 14.2%; $p < 0.0001$; OR = 2.54; intervalo de confiança a 95% = 1.76-3.66).

O valor médio de IMC da população SAOS foi de 29.4 em homens e 29.9 nas mulheres. Os pacientes com SAOS, mas que não eram obesos, registaram um IMC de 26.6 nos homens e 24.7 nas mulheres, e os pacientes obesos com SAOS registaram um IMC de 33.9 nos homens e 35.7 nas mulheres.

Para aferir se a presença do alelo DRB1*03 influencia na obesidade, os pacientes com SAOS foram divididos em dois grupos: não obesos (IMC < 30) e obesos (IMC ≥ 30). A frequência deste alelo era mais baixa em pacientes não obesos do que em pacientes obesos (20.8% vs. 30%, respetivamente), no entanto a diferença observada não é estatisticamente significativa (Quadro 14). Além disso, fizemos a mesma análise para o grupo sem SAOS, não se verificando da mesma forma diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes obesos e os não obesos (9.5% vs. 16%, respetivamente).

		HLA-DRB1*03
IMC<30	TODOS (N = 77)	16 (20.8%)
	HOMENS (N = 68)	13 (19.1%)
	MULHERES (N = 9)	3 (33.3%)
IMC ≥ 30	TODOS (N = 50)	15 (30.0%)
	HOMENS (N=42)	13 (30.9%)
	MULHERES (N=8)	2 (25.0%)

Quadro 14: Prevalência de HLA-DRB1*03 em pacientes com SAOS (obesos/não obesos) (n = 127). Informação do IMC indisponível em quatro dos 131 pacientes.

Os resultados deste estudo foram publicados na Revista Neurologia (Silva, L et al, 2015, com o título “Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono e HLA no Norte de Portugal”), ver texto final em Anexo.

4.4.3.2. SAOS e HLA-A2

Dado que a obesidade é um fator confundidor em estudos genéticos e é o principal fator de risco, a seguir ao género masculino, para o desenvolvimento de SAOS, pretendemos nesta parte do estudo explorar o papel do HLA-A*02 na obesidade em doentes com SAOS. Nem todos os indivíduos obesos exibem SAOS. A obesidade aumenta significativamente o risco de SAOS, enquanto a perda de peso reduz a severidade da síndrome.

Em 1993, Yoshizawa et al. estudaram 32 pacientes Japoneses do sexo masculino com SAOS e observaram que a frequência do antígeno HLA-A2 era significativamente mais elevada nos pacientes quando comparado com a população controlo (81% vs. 49%, $p<0.035$), concluindo assim que este antígeno pode ser um marcador genético importante para a predisposição à SAOS. Adicionalmente, os autores observaram que os pacientes com HLA-A2 eram mais obesos do que os que tinham este antígeno ausente. Concluíram então que era devido à existência deste marcador na obesidade.

Para avaliar as relações SAOS HLA-A2 estudamos uma coorte de 127 doentes com SAOS a qual foi sujeita aos mesmos procedimentos de investigação clínica e laboratorial aplicados aos outros estudos HLA e já descritos anteriormente.

A população controlo era constituída por 78 indivíduos saudáveis (48 homens e 30 mulheres, com idade média=43.5±12.38 anos) recrutada entre dadores de sangue da mesma região. A genotipagem do alelo HLA-A*02 foi efetuada pela metodologia de PCR-SSP, à

semelhança do atrás descrito para o HLA-DRB1*03. Todos os participantes do estudo foram classificados de acordo com a presença ou ausência do alelo HLA-A*02 no seu genótipo. Análise de regressão logística foi utilizada para avaliar a associação entre o HLA-A*02 e a SAOS após o ajustamento potencial das variáveis.

Os resultados deste estudo revelaram que quando comparamos a presença de obesidade através do IMC em ambos os grupos verificamos que nos doentes com SAOS há mais obesos que na população controlo [39,4% SAOS vs. 17,9% PC; $p=0.001$; $OR=2,97$ (1,51-5,85)]. Além disso, os doentes com SAOS têm um IMC superior ao dos controlos (29.4 ± 4.7 SAOS vs. 26.6 ± 3.4 PC; $p<0.00001$) (Quadro 15).

		Doentes		Controlos		Valor p
		n	%	n	%	
IMC < 30 kg/m ²	Total	77	60.6	64	82.1	0.001
	Homens	68	88.3	39	60.9	
	Mulheres	9	11.7	25	39.1	
IMC ≥ 30 kg/m ²	Total	50	39.4	14	17.9	0.001
	Homens	42	84	9	64.3	
	Mulheres	8	16	5	35.7	

Quadro 15: distribuição da população estudada de acordo com o IMC.

Para analisar o possível papel dos alelos HLA na SAOS, os doentes foram genotipados para o alelo HLA-A*02 e comparados com a população controlo. A frequência do alelo HLA-A*02 foi semelhante em ambos os grupos (44,1% OSAS vs. 48,7% PC; $p=0.519$) (Quadro 16). Quando se considerou o IMC destas populações, verificou-se também não existirem diferenças significativas entre indivíduos obesos ($IMC \geq 30$ kg/m²) e não obesos ($IMC < 30$ kg/m²), quer na população controlo (35,7% nos obesos vs. 51,6% nos não obesos; $p=0.283$) quer nos doentes com SAOS (38% nos SAOS obesos vs. 48,1% nos SAOS não obesos; $p=0.265$).

	Doentes		Valor p	Controlos		Valor p
	A*02+	A*02-		A*02+	A*02-	
IMC < 30 kg/m ²	37 (48.1%)	40 (51.9%)	0.265	33 (51.6%)	31 (48.4%)	0.283
IMC ≥ 30 kg/m ²	19 (38.0%)	31 (62.0%)		5 (35.7%)	9 (64.3%)	

Quadro 16: Prevalência de HLA-A*02 em pacientes com SAOS e controlos em função do IMC.

Com base nos trabalhos publicados (Yoshizawa et al., 1993 e Brunetti et al., 2005), insistimos na análise destes doentes com SAOS e estudamos a possibilidade da associação entre a presença e a ausência destes antígenos HLA-A*02 e o índice de gravidade da SAOS (ligeira, moderada e grave). Os resultados encontrados (ver Quadro 17) permitem-nos dizer que, a presença do alelo HLA-A*02 é menos frequente no grupo de doentes com grau de apneia grave quando comparado com os doentes com grau de apneia moderada (50.0% vs. 28.2%, OR=0.393, 95% IC=0.165-0.935), tendo esta diferença um valor estatisticamente significativo.

	n (%)	OR (95%CI)	Valor p
HLA-A*02			0.059
Ligeira (n=58)	29 (50.0)	1	
Moderada (n=30)	16 (53.3)	1.143 (0.473-2.763)	0.668
Grave (n=39)	11 (28.2)	0.393 (0.165-0.935)	0.035

Quadro 17: Frequência fenotípica do alelo HLA-A*02 na SAOS ligeira, moderada e grave

4.4.3.3. SAOS e APOE

Como atrás explicámos, os resultados obtidos em estudos de diversas coortes de doentes com SAOS e os genes APOE têm revelado resultados contraditórios, se por um lado alguns autores consideram que há uma associação (Kadotani et al, 2001; Foley et al, 2001;

Varvarigou et al, 2011; Kalra, et al, 2008; Larkin et al, 2006; Uyum et al, 2015) outros estudos contradizem esses dados (Thakre et al, 2009; Xu et al, 2015).

Depois de uma revisão da literatura investigamos os polimorfismos do gene da APOE nos nossos doentes, demonstrando também uma ausência de associação entre esses polimorfismos e a SAOS. Os resultados dessa pesquisa são seguidamente descritos.

Foram estudados 204 doentes (145 homens e 59 mulheres, idade média=54,2±12 anos), 113 dos quais exibiam SAOS (99 homens e 14 mulheres com médias de idade semelhantes 54/55.2 anos) e 91 apresentavam outras patologias de sono. A população controlo foi constituída por 285 indivíduos saudáveis entre dadores de sangue da mesma região geográfica.

As frequências genotípicas dos alelos ApoE nos doentes com SAOS, nos doentes com outras doenças do sono e na população controlo, estão descritos no Quadro 18, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas. O genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ é o mais representado em todos os grupos e os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 4$ e o $\epsilon 4/\epsilon 4$ estão ausentes no grupo de doentes com SAOS ou com outras doenças de sono.

	PC (n=285) % (n)	SAOS (n=113) % (n)	OPS (n=91) % (n)	SAOS vs. PC (valor de p)	OPS vs. PC (valor de p)	SAOS vs. OPS (valor de p)
Genótipos APOE						
E2/E3	12.6 (36)	11.5 (13)	14.3 (13)	0.758	0.683	0.554
E2/E4	1.1 (3)	0 (0)	0 (0)	0.274	0.326	-
E3/E3	72.6 (207)	72.6 (82)	71.4 (65)	0.990	0.823	0.857
E3/E4	13.3 (38)	15.9 (18)	14.3 (13)	0.502	0.817	0.745
E4/E4	0.4 (1)	0 (0)	0 (0)	0.528	0.572	-
Alelos ApoE						
E2	6.8 (39)	5.8 (13)	7.1 (13)	0.575	0.889	0.568
E3	85.6 (488)	86.3 (195)	85.7 (156)	0.807	0.973	0.869
E4	7.5 (43)	8 (18)	7.1 (13)	0.841	0.858	0.755

PC - População Controlo; SAOS; OPS - Outras patologias de Sono

Quadro 18: Frequências alélicas dos genótipos APOE na SAOS, outras doenças de sono e na população controlo.

A frequência dos alelos da ApoE era semelhante entre os diferentes grupos. Considerando a gravidade da SAOS em função dos 3 subgrupos habituais (ligeira, moderada e

severa), o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ era mais frequente no grupo de apneias graves embora estatisticamente não significativo (14.0% ligeira vs. 13.8% moderada vs. 20.6% severa, $p=0.674$) (Quadro 19).

	Ligeira (n=50)	Moderada (n=29)	Grave (n=34)	p
$\epsilon 2 / \epsilon 3$	14.0%	6.9%	11.8%	0.634
$\epsilon 3 / \epsilon 3$	72.0%	79.3%	67.6%	0.582
$\epsilon 3 / \epsilon 4$	14.0%	13.8%	20.6%	0.674

Quadro 19: Frequências dos genótipos APOE na SAOS em função da gravidade da apneia.

Decidimos efetuar uma meta-análise de forma a ter uma visão global dos estudos efetuados até à data. Foram analisados 12 populações referidas na bibliografia, desde 1998 até 2015. Foram assim incluídas 11 publicações com os nossos critérios de inclusão às quais adicionamos o nosso estudo. Os dados conjuntos dos estudos incluídos, reportam-se a uma amostra total de 2995 doentes com SAOS e 6036 controlos (Quadro 20).

Oito dos estudos incluídos encontram uma associação entre o $\epsilon 2$ e o desenvolvimento da SAOS. Dois destes estudos (Larkin et al, 2006; Uyrum et al, 2015) referem que o alelo ApoE $\epsilon 2$ allele confere um risco elevado para o desenvolvimento de SAOS, os seis restantes incluindo o nosso (Saarelainen et al., 1998; Cosentino et al., 2008; Nikodemova et al., 2013; Tisko et al., 2014; Osorio et al., 2014).

Da análise geral destes estudos podemos verificar que não há associação entre o alelo ApoE $\epsilon 2$ e o desenvolvimento da SAOS (OR [95%] = 0.962 [0.750 – 1.28]).

Onze estudos focaram a sua análise numa associação entre o alelo ApoE $\epsilon 4$ e o desenvolvimento da SAOS. Dois estudos (Gozal et al. 2007; Kadotani et al, 2001) reportam que existe uma associação para a suscetibilidade à SAOS com o alelo ApoE $\epsilon 4$, porém Larkin et al, 2006, descreveu que esta isoforma pode ser um fator protetor para a o desenvolvimento da SAOS. Os restantes estudos, incluindo o nosso não encontram associação entre o alelo ApoE $\epsilon 4$ e o desenvolvimento de SAOS (OR [95%CI] = 1.10 [0.88 – 1.37]). Embora estes estudos sejam heterogéneos não há evidência de existir enviesamento nos resultados das publicações.

Estudo	PC	SAOS	ε4		ε2	
			OR	95% CI	OR	95% CI
Saarelainen et al; 1998 [25]	728	291	1	0.75 - 1.33	0.8	0.52 - 1.25
Foley et al; 2001 [20]	416	302	0.78	0.53 - 1.16	N.R.	N.R.
kadotani et al; 2001 [19]	724	67	1.83	1.09 - 3.06	N.R.	N.R.
Gottlieb et al; 2004 [22]	1437	338	1.25	0.96 - 1.63	N.R.	N.R.
Larkin et al; 2006 [12]	796	415	0.75	0.58 - 0.97	1.46	1.02 - 2.08
Gozal et al; 2007 [18]	199	146	8.04	2.3 - 28.15	N.R.	N.R.
Cosentino et al; 2008 [15]	121	123	1.21	0.64 - 2.31	1.25	0.48 - 3.28
Nikodemova et al; 2013 [23]	1146	697	0.9	0.73 - 1.11	0.93	0.7 - 1.22
Tisko et al; 2014 [17]	128	391	N.R.	N.R.	0.71	0.4 - 1.27
Osorio et al; 2014 [24]	25	70	1.18	0.43 - 3.23	0.59	0.18 - 1.97
Uyrum et al; 2015 [16]	31	42	2.9	0.559 - 15.01	9.37	1.13 - 77.72
Silva et al; 2015	285	113	1.061	0.598 - 1.88	0.831	0.435 - 1.588

Quadro 20: Estudos incluídos na meta-análise





5. *Capítulo 5.* ***DISCUSSÃO***



DISCUSSÃO

Nos estudos que efetuamos caracterizamos clínica e graficamente uma população de doentes com síndrome de apneia obstrutiva de sono (SAOS) que num determinado período, ocorreu à Consulta de Sono de um Hospital diferenciado.

Da análise dos resultados encontrados ressalta que as características demográficas dos doentes estudados, com SAOS, assemelham-se às de outras populações (AASM-ICSD 3, 2014; Jordan et al., 2003), com maior incidência nos homens (87% homens vs. 13% mulheres; rácio por sexo 8:1). Confirma-se assim que o sexo masculino é um fator de risco para a SAOS enquadrando-se no rácio homens/mulheres 4:1 a 10:1 descritos por Jordan et al., 2003 e também se verificou que a SAOS é mais frequente em pacientes de meia-idade, com uma idade média de cerca de 55.1 anos.

Além disso esta população apresentava também fatores individuais semelhantes que influenciam a SAOS, e em que pontificam a obesidade e outras comorbilidades enquadradas no espectro metabólico, tendo em conta a gravidade da SAOS definida pelo índice de apneia hipopneia por hora (IAH).

Definidas estas relações e dado que várias linhas de investigação tinham sugerido que a SAOS tem um forte componente hereditário (Palmer et al., 2003) e outras de que ocorrem *cluster* de SAOS em famílias (ISCD 3), dirigimos a nossa investigação para o estudo da importância de fatores genéticos (alelos HLA e APOE) nessa população de SAOS. Finalmente e dada a importância dos genes relacionados com a obesidade, estrutura craniofacial, e os tecidos moles, estruturas habitualmente implicadas na suscetibilidade à SAOS, também abordamos esta questão estudando um conjunto de polimorfismos desses mesmos genes.

5.1. RELAÇÃO ENTRE SAOS, OBESIDADE E RISCO DE COMORBILIDADES

Várias comorbidades estão frequentemente associadas a patologias do sono e podem ser a razão pela qual diversas alterações do sono têm semiologia tão diversa. A SAOS é uma patologia do sono que frequentemente está associada a outras condições mórbidas e, de entre estas, às entidades metabólicas. Estas entidades, a saber, a obesidade, as perturbações cardiovasculares ou a diabetes fazem parte do chamado “síndrome metabólico” que interfere na estrutura do sono (Schimd et al., 2015). Essas entidades metabólicas também são, neste estudo, as que mais frequentemente se associam à SAOS.

A obesidade é a comorbidade mais frequentemente associada à SAOS e a que promove um maior risco para a SAOS (Kaparianos et al., 2006), quer em adultos (Bonsignore et al., 2012) quer em crianças (Riha, 2009 e Bonsignore et al., 2012). O mecanismo sugerido para esta influência parece ser a redução do diâmetro interior da nasofaringe como resultado de uma deposição de tecido gordo nas vias aéreas superiores ou como resultado da hipoventilação causada pela diminuição da expansão torácica (Riha, 2009, Kaparianos et al., 2006). Também se sabe que a redução do peso corporal reduz a gravidade da situação clínica. No nosso estudo analisamos esta associação (SAOS e Obesidade) bem como a associação de outras comorbidades atuando como fatores agravantes da SAOS.

A fim de contribuir para o estudo do papel das comorbidades na SAOS estudamos duas populações de pacientes, uma com SAOS e outra população com alterações do sono (sem perturbação respiratória). Analisamos a distribuição de comorbidades no grupo geral de doentes com SAOS e nos subgrupos de gravidade da apneia. Testamos ainda a influência das comorbidades, comparando os resultados em pacientes com SAOS e pacientes sem patologia respiratória.

Demonstramos neste trabalho que a associação entre SAOS e comorbidades é comum dado que afeta 75% dos pacientes com SAOS. A fim de testar se esta associação é específica para a SAOS, investigámos a presença das mesmas comorbidades no grupo de doentes com alterações do sono, mas sem patologia respiratória. Verificamos neste caso que essa associação era menor (61%), o que nos permite concluir que a associação de comorbidades é significativamente maior em pacientes com SAOS do que em doentes com alterações do sono, mas sem patologia respiratória.

Constatamos que as comorbilidades são mais frequentes em pacientes com apneia mais grave e que a obesidade é a entidade mais comum e mais frequentemente associada aos casos mais graves. Todavia, quando várias comorbilidades estão presentes a influência da obesidade é menos evidente. Os tipos de comorbilidades encontradas em doentes com alterações do sono, mas sem patologia respiratória, são semelhantes mas têm uma ordenação diferente quanto à frequência, sendo as patologias cardiovasculares e a hipertensão arterial as comorbilidades mais frequentes surgindo a obesidade em terceiro lugar.

Também analisamos a relação entre a obesidade e a gravidade da SAOS. Esta influência ficou bem documentada na análise dos doentes com SAOS e com múltiplas comorbilidades. Quando analisamos a distribuição das comorbilidades nos subgrupos de gravidade da SAOS a obesidade está sempre presente nos casos com apneia mais grave. Como descrevemos nos resultados, se excluirmos os doentes sem obesidade não encontramos doentes no grupo das apneias mais graves. Além disso os dados que encontramos também demonstram que os casos menos graves de apneia estão mais associados a outros fatores que não à obesidade. Quando a SAOS está associada a outra comorbilidade, a importância da obesidade por si só é mais clara, aparecendo como um fator de agravamento da apneia e não como uma condição mórbida que provoca o quadro clínico.

Em conjunto, estes resultados permitem analisar melhor a relação entre comorbilidades e SAOS. Por um lado e porque as comorbilidades ocorrem frequentemente em casos menos graves de apneia compreende-se que a SAOS influencia negativamente o curso dessas entidades clínicas. Daí decorrer o risco da hipertensão arterial e das doenças cardiovasculares se agravarem com a ocorrência da apneia. Por outro lado, sendo a obesidade o fator mais importante para o aumento da gravidade da SAOS, a sua evolução com o consequente agravamento da estrutura do sono e deterioração da condição metabólica do doente, será necessariamente muito condicionada por esse fator.

5.2. RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS (SNP's) e SAOS

Tendo como base a análise efetuada referente aos polimorfismos genéticos conseguimos demonstrar a associação entre vários polimorfismos genéticos e a SAOS.

5.2.1. Genes associados à Obesidade

Da comparação da frequência dos diversos alelos entre os subgrupos Outras Patologias *vs* População Controlo observamos que o alelo G do rs2227674 do gene SERPINE1, apresenta um valor estatisticamente significativo, presumindo-se assim que este SNP representa um risco aumentando para a presença da obesidade no subgrupo Outras Patologias.

Relativamente aos genótipos e comparando os grupos Outras Patologias *vs* População Controlo observamos diferenças significativas para o genótipo GA do rs1137101, do gene LEPR. Este resultado sugere que este SNP pode ter um papel protetor da obesidade neste subgrupo de doentes. Ainda comparando os mesmos subgrupos, o genótipo GA do rs2227674 do gene SERPINE1, parece ser um genótipo indicativo de risco aumentado para a obesidade.

5.2.2. Genes associados aos Tecidos Moles

Relativamente à análise haplotípica verificamos que nos genes CKM do cromossoma 19, se encontra um conjunto de haplótipos que apresentam diferenças significativas entre o grupo de população com SAOS e a População Controlo.

Da mesma forma quando a comparação foi efetuada entre o grupo de população com SAOS e Outras Patologias, também observamos diferenças significativas num conjunto de haplótipos para os mesmos genes CKM do cromossoma 19. Estes resultados sugerem que genes do CKM atuam em conjunto na suscetibilidade à SAOS. Já em 2003 Palmer et al., reportaram a importância do cromossoma 19 para o índice de apneia/hipopneia na suscetibilidade à SAOS.

5.2.3. Genes associados à Estrutura Craneofacial

Da comparação da frequência alélica entre os subgrupos SAOS *vs* População Controlo observamos que o alelo C do rs2981575, do gene FGFR2, é mais frequente na SAOS e a diferença é estatisticamente significativa. O mesmo acontece no caso da comparação entre

SAOS *vs* Outras Patologias também para o mesmo alelo C. Presume-se assim que este SNP, em ambos os casos, representa um risco aumentando para a presença de alterações da estrutura craniofacial, alterações essas que são potenciadoras de SAOS.

Relativamente aos genótipos e comparando os grupos SAOS *vs* População Controlo observamos diferenças significativas para os genótipos TC e TT do rs2981575 do gene FGFR2, e para o genótipo CC do rs4803455 do gene TGFB1, ambos funcionando como genótipos protetores. Na comparação entre Outras Patologias *vs* População Controlo observamos diferenças significativas para o genótipo TC do rs2981575 e para o genótipo CC do rs4803455 também indicando serem genótipos protetores.

Na análise haplotípica, e relativamente ao gene TGFB1 localizado no cromossoma 19 foram observadas diferenças significativas entre o grupo SAOS e controlo, demonstrando a importância deste haplótipo para a doença. Estas observações suportam o envolvimento do cromossoma 19 na SAOS tal como atrás referido.

5.2.4. Outros genes associados

Da comparação da frequência alélica entre os subgrupos SAOS *vs* População Controlo verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas para o alelo G do rs705382 do gene PON1, indicando um risco aumentado para SAOS. Na comparação entre Outras Patologias *vs* População Controlo verificamos que também existem diferenças estatisticamente significativas para o alelo C do mesmo rs705382. Observamos ainda e no contexto desta comparação (Outras Patologias *vs* População Controlo) que a presença do alelo C do rs6123832 apresenta um valor estatisticamente significativo, o que é indicativo de um risco aumentado para Outras Patologias.

Relativamente aos genótipos e comparando os grupos Outras Patologias *vs*. População Controlo observamos diferenças significativas para os genótipos CG e CC do rs705382 do gene PON1 em ambos os casos o que se traduz num risco aumentado de doença para as Outras Patologias. No mesmo subgrupo os genótipos CT e CC do rs854573 do gene PON1, apresentam também valores estatisticamente significativos, aqui funcionando como um elemento protetor.

Na análise haplotípica foram observadas diferenças significativas entre o grupo SAOS e o das Outras Patologias, demonstrando-se assim a importância deste haplótipo na doença. Considerando ainda o gene PON1 encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Outras Patologias e a População Controlo.

As associações observadas com o gene PON1 poderão ser entendidas no contexto das comorbilidades (nomeadamente cardiovasculares) frequentemente associadas à SAOS.

Da análise efetuada *in silico*, utilizando o programa FuncPred, observamos que o SNP rs705382, do gene PON1, pode levar a uma alteração no local de ligação de um factor de transcrição. O mesmo acontece em relação ao rs854573, do gene PON1. Relativamente ao rs1137101, do gene LEPR, verificamos que este SNP pode levar à alteração de um local de splicing. Esta análise vem comprovar que estes SNPs poderão ter numa função biológica importante para a fisiopatologia da SAOS.

5.3. RELAÇÃO ENTRE GENES DO SISTEMA HLA e SAOS

No âmbito do estudo dos determinantes genéticos da SAOS investigamos nos nossos doentes a relação entre esta entidade clínica e os genes do Sistema HLA. Tendo em conta os resultados dos estudos de outras séries dirigimos a nossa atenção para a associação com os antígenos HLA- DRB1*03 e HLA- A*02.

5.3.1. Estudo da associação HLA- DRB1*03 e SAOS

Neste estudo demonstramos a existência de uma associação entre o alelo HLA-DRB1*03 e a SAOS (24% em SAOS vs. 15% na Pop. Controlo; $p = 0.025$) e que essa associação é independente do género. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Brunetti et al, nos quais o alelo HLA-DRB1*03 aparece sobre-representado em crianças italianas com SAOS (24.4% vs. 12.8%; $p = 0.03$) (Brunetti et al., 2005).

Atualmente desconhece-se a forma como os alelos HLA influenciam a SAOS. Quer os resultados do presente estudo em adultos, quer os obtidos em crianças (Brunetti et al., 2005), abordam esta questão e estimulam o debate. Como contributo para este debate, salientamos que a SAOS em crianças e em adultos poderá ter uma base fisiopatológica diferente. A associação HLA-SAOS observada em algumas populações sugere que certos indivíduos com estas características genéticas são mais propensos a sofrer de perturbações do sono (SAOS). Outro modo de encarar a questão baseia-se na hipótese avançada por Riha, 2009 que considera que "o genótipo da síndrome de apneia/hipopneia obstrutiva do sono está

condicionado pela inexistência de uma definição coerente do fenótipo que pode ser diferente em certos momentos da evolução da doença. O conceito de individualização de um resultado significativo num "momento específico" em pacientes com SAOS pode ajudar à compreensão dos resultados obtidos em populações étnica e demograficamente diferentes.

Na verdade, os estudos em pacientes com SAOS, realizados na Ásia e em outros Países Europeus, evidenciaram diferentes associações com o HLA. Num estudo japonês de Yoshisawa et al., 1993 numa coorte de 32 homens com SAOS não se demonstrou associação entre os alelos HLA-DR e os pacientes com SAOS. Um estudo coreano de Lee et al., 2005 realizado com 25 pacientes (24 homens, 1 mulher) com SAOS aponta para uma maior frequência do alelo HLA- DRB1*09 (23% SAOS vs. 16% Pop. Controlo). Nesse mesmo estudo, os autores restringiram a análise aos casos de apneia mais graves e descreveram a existência de um aumento da frequência do alelo HLA-DRB1*08 (36% na SAOS vs. 20% em população de controlo). Os estudos que realizamos não corroboram estas observações. Ambos os estudos são importantes, mas não analisaram coortes representativas. Cabe salientar que outros fatores, como a origem étnica, e características demográficas inerentes, das quais se destaca o rácio entre géneros, podem estar implicadas na génese destas associações.

O estudo japonês anteriormente referido revela que "os pacientes portadores do alelo HLA-A2 eram mais obesos do que os pacientes que não possuíam este alelo" e "que a maior incidência da SAOS nos pacientes se deve à influência deste marcador genético sobre a obesidade" (Yoshisawa et al., 1993). Os resultados deste estudo foram posteriormente questionados como sofrendo de um viés. De facto o número de obesos entre os pacientes com SAOS era significativamente mais elevado que na população controlo (Brunetti et al., 2005). Tal como noutras doenças, as interações entre o genótipo HLA e o IMC (como medida da obesidade) são ainda objeto de debate acerca do papel do HLA na obesidade. Estudos recentes abordam esta temática para outras patologias do sistema nervoso (Hedström et al., 2014, Roedig et al., 2014).

A prevalência da obesidade (39.4%) na nossa coorte é quase o triplo da que é descrita para a população portuguesa em geral (14.2%) (do Carmo et al., 2008). Os nossos resultados demonstram que a obesidade aumenta, três a quatro vezes, o risco de desenvolver SAOS (OR = 3.93). Estes resultados estão de acordo com os estudos que documentam a obesidade como

um fator comum e patogénico de SAOS em adultos (Redline e Tishler, 2000; AASM-ICSD 3, 2014; Smith et al., 1985; Procaccini et al., 2011; Gami et al., 2003; Young et al., 2005).

Demonstramos que a SAOS está relacionada com o alelo HLA-DRB1*03 e também com a obesidade. A fim de evitar o possível efeito confundidor da obesidade na associação observada efetuamos uma análise de regressão ajustada à idade, ao género e ao IMC, de modo a clarificar e evitar possíveis viés da influência deste alelo na obesidade. Os resultados destas análises reforçam as nossas conclusões acerca da relação entre o HLA-DRB1*03 e a SAOS, e de que essa relação é independente da obesidade, no grupo de pacientes que avaliamos.

5.3.2. Estudo da relação HLA- A*02 e SAOS

Na mesma população de doentes com SAOS analisamos a possível associação entre o alelo HLA-A*02 e a SAOS. Contrariamente a outros estudos publicados, não observamos qualquer associação.

Assim, pela análise que efetuamos nos doentes, observamos que o alelo HLA-A*02 não é um fator de suscetibilidade para a SAOS (44.1% SAOS vs. 48.7% na população controlo, $p=0.519$). Também constatamos que esse alelo não é um fator de suscetibilidade para a obesidade, quer na população de controlo (35.7% nos obesos vs. 51,6% em não obesos; $p=0.283$) quer nos doentes com SAOS (38% nos doentes SAOS com obesidade vs. 48.1% nos doentes SAOS sem obesidade; $p=0.265$).

Como anteriormente descrevemos em 5.3.1. e embora o alelo HLA-DRB1*03 seja um fator de suscetibilidade para a SAOS, não encontramos relação de suscetibilidade entre este alelo e a obesidade nos doentes com SAOS.

Demonstramos a associação do alelo HLA-A*02 com as formas menos graves de SAOS. Verifica-se que para as apneias ligeiras ou moderadas a associação é semelhante. Esta observação sugere que este alelo possa ser um marcador de melhor prognóstico para a gravidade da SAOS (50% nas apneias ligeiras e 53% nas apneias moderadas e 48,7% na população controlo), enquanto que nas apneias graves é de apenas 28,7%. Ora como vários autores consideram que a melhor distinção do grau de gravidade de apneia é feita apenas entre

2 grandes grupos (grave e moderada/ligeira) esta distinção na frequência dos alelos pode ajudar a suportar este conceito, que obviamente terá de ser confirmado mais tarde.

5.4. RELAÇÃO ENTRE GENES DA APOE E A SAOS

Da análise dos estudos publicados da relação entre APOE e SAOS é sugerido que a SAOS tem uma componente hereditária (Palmer et al., 2003). A análise de todo o genoma de famílias com SAOS evidencia um pico de ligação no cromossoma 19 que inclui o gene da ApoE (Palmer et al., 2003). No entanto, os resultados obtidos na população que estudamos indicam que é improvável que as isoformas da ApoE contribuam significativamente para a suscetibilidade à SAOS. Esta observação está de acordo com vários outros estudos recentes, que refutam a probabilidade de tal associação (Varvarigou et al., 2011; Thakre et al., 2009; Xu et al., 2015; Gottlieb et al., 2004; Nikodemova et al., 2013; Osorio et al., 2014). Saarelainen et al. 1998 foi quem sugeriu, pela primeira vez, esta ausência de associação. Posteriormente, estudos de replicação mostram resultados contraditórios para o alelo ApoE $\epsilon 4$ sendo descrito por uns como um fator de suscetibilidade (Gozal et al., 2007; Kadotani et al., 2001) e por outros como um fator de proteção para a SAOS (Larkin et al., 2006). Também a associação de SAOS com ApoE $\epsilon 2$ foi documentada (Larkin et al., 2006; Cosentino et al., 2008). Devido a estes resultados inconsistentes, Kalra et al., 2008, estudaram o gene ApoE utilizando a metodologia “SNP Tag” e encontraram que os SNPs a montante da região promotora do gene da ApoE estão associados ao desenvolvimento de SAOS em crianças (Kalra et al., 2008).

Recentemente, Uyum et al, 2015, descreveram que os alelos ApoE $\epsilon 4$ e o alelo ApoE $\epsilon 2$ poderiam ser fatores de suscetibilidade para a SAOS. No entanto, uma meta-análise recente não confirma estes resultados (Xu et al., 2015). Na meta-análise realizada no nosso estudo reunimos os dados de mais pacientes e controlos (dados de Uyum et al., 2015 e da nossa coorte) melhorando assim o poder estatístico da análise. Os resultados obtidos estão de acordo com a meta-análise anterior. No entanto, encontramos heterogeneidade entre os estudos e essa heterogeneidade não pode ser explicada pelas diferenças nas características demográficas ou étnicas (Xu et al., 2015). Essa heterogeneidade pode ser reflexo das interações gene-gene ou gene-ambiente não consideradas neste tipo de estudos. Além disso, outros genes candidatos

na região da ApoE também devem ser considerados (Larkin et al., 2006). Por exemplo, o genes que influenciam a função muscular (CLPTM1) a forma craniofacial e as respostas à hipoxemia, variáveis frequentemente envolvidas na SAOS e que podem ter um papel potencial na patofisiologia da SAOS. O mesmo acontece com o gene do lábio leporino ou associado à membrana palatina (DMPK), e também com o gene HIF3A, que é um gene que codifica para o fator indutor de hipoxia. Por tudo isso será necessário um mapeamento fino da região para melhor refinar a genética da SAOS.

Apesar da aparente falta de associação entre as isoformas da ApoE e suscetibilidade para a SAOS, é possível que este gene possa ter um papel na etiopatogenia da SAOS por outro mecanismo. De acordo com esta hipótese Pellegrino et al., 2011 propuseram que os polimorfismos da ApoE, em vez de conferirem risco, poderiam estar envolvidos na modulação das consequências adversas das alterações respiratórias do sono. Está também bem documentado que o gene da ApoE tem um papel importante na função neurocognitiva, recuperação de lesão cerebral e stress oxidativo e resposta inflamatória (Kalra et al., 2008; Kheirandish et al., 2005; O'Hara et al., 2009). Isto significa que a presença de determinada isoformas da ApoE pode promover o desenvolvimento de sintomas como consequência da hipoxia intermitente, como é observado na SAOS.

Os estudos de associação podem ser influenciados por diferenças genéticas entre grupos étnicos. Por exemplo a frequência do alelo APOE ϵ 4 é diversa em diferentes populações. Varia entre 10 e 23%, sendo superior nas populações do norte da Europa e em populações da América do Norte e Canadá de descendência europeia, do que no sul da Europa (Gerdes et al., 1992). Por conseguinte, a contribuição do polimorfismo ϵ 4 para a SAOS está condicionada pela localização geográfica dos doentes, podendo não ser a mesma para todas as populações.



6. *Capítulo 6.* CONCLUSÕES



CONCLUSÕES

Dos estudos realizados no âmbito desta Tese ressaltam as seguintes conclusões:

- Que na população com SAOS da Consulta de Sono de um Hospital Central, estudada consecutiva e prospectivamente, as características demográficas e individuais eram semelhantes a de outros estudos de SAOS: franco predomínio do sexo masculino (6:1), média de idades de 54,5 anos, índice de massa corporal médio próximo da obesidade (29,3) e na grande maioria sem história familiar da doença.
- Que a obesidade e as comorbilidades integradas no espectro das alterações metabólicas, são entidades frequentemente associadas à SAOS, independentemente da gravidade da doença. Esta associação é comum mesmo em casos não graves de SAOS, sendo a obesidade um fator determinante no agravamento do quadro clínico. Ambas as associações encontradas têm fortes implicações na definição da melhor estratégia para o tratamento desta entidade clínica.
- Que os polimorfismos genéticos descritos para a obesidade, estrutura craniofacial e tecidos moles, quando presentes, estão significativamente associados à SAOS. Esses polimorfismos estão presentes em genes implicados na Obesidade (SERPINE1 e LEPR), nos Tecidos Moles (CKM) e nas estruturas craniofaciais (FGFR2 e TGFB1). Outros Genes também encontrados como associados (PON1) podem estar indirectamente implicados na SAOS dada a sua presença nas comorbilidades mais frequentemente associadas à SAOS.
Os resultados obtidos demonstram que estes SNPs podem ter uma função biológica importante na patofisiologia da SAOS.
- Que o alelo HLA- DRB1*03 é um fator de suscetibilidade para a ocorrência da SAOS e que o sexo masculino e a obesidade constituem fatores de risco para a SAOS. O alelo HLA-A*02 não é um fator de suscetibilidade para a SAOS sendo provavelmente um fator de proteção para os casos de SAOS mais grave.
- Que os dados disponíveis decorrentes do nosso trabalho não suportam uma associação significativa entre os genes da ApoE e o risco de SAOS.

Estas conclusões permitem-nos responder às questões inicialmente formuladas nesta Tese, sobre os Determinantes Genéticos Implicados na Fisiopatologia da Síndrome de Apneia Obstrutiva Do Sono (SAOS):

1 - Existem fatores individuais geneticamente determinados que estão associados à SAOS ou que são mais comuns em doentes com SAOS?

Sim, existem e foram identificados neste trabalho como sendo genes do Sistema HLA e genes relacionados com a Obesidade, Estrutura Craneofacial e Tecidos Moles.

2 - Esses fatores atuam isoladamente ou, para a SAOS se manifestar, têm de estar associados?

Sim, os fatores individuais (genéticos) presentes têm de estar associados a outros (tais como o género, e a obesidade) para a ocorrência da SAOS e para o seu agravamento.

Em conclusão, e em resultado deste trabalho, podemos afirmar que existem determinantes genéticos implicados na fisiopatologia da Síndrome da Apneia Obstrutiva de Sono que associados a fatores individuais ou ambientais contribuem para o fenótipo e influenciam a sua gravidade.



7. *Capítulo 7.* ***BIBLIOGRAFIA***



BIBLIOGRAFIA

1. Akinnusi ME, Saliba R, Porhomayon J, El-Solh AA. Sleep disorders in morbid obesity. Review article. *European Journal of Internal Medicine* 2012; 23: 219–226
2. Alonderis, A, Barbé, F, Bonsignore, M, Calverley, P, De Backer, W, Diefenbach, K, Donic, V, Fanfulla, F, Fietze, I, Franklin, K, Grote, L, Hedner, J, Jennum, P, Krieger, J, Levy, P, McNicholas, W, Montserrat, J, Parati, G, Pascu, M, Penzel, T, Riha, R, Rodenstein, D, Sanna, A, Schulz, R, Sforza, E, Sliwinski, P, Tomori, Z, Tonnesen, P, Varoneckas, G, Zielinski, J, & Kostelidou, K , 'Medico-legal implications of sleep apnoea syndrome: driving license regulations in Europe', *Sleep Medicine*, 2008; 9: 362-375.
3. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders, 3rd ed. Darien, IL : American Academy of Sleep Medicine, 2014
4. American Academy of Sleep Medicine. ICSD-2 - International Classification of Sleep Disorders, 2nd ed.: Diagnostic and coding manual, Westchester, Illinois, American Academy of Sleep Medicine, 2005
5. American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, revised: Diagnostic and coding manual. Chicago, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2001
6. Angelico, F., del Ben, M., Augelletti, T., de Vita, R., Roma, R., Violi, F., & Fabiani, M. Obstructive sleep apnoea syndrome and the metabolic syndrome in an internal medicine setting. *European Journal Of Internal Medicine*, 2010: 191-195.
7. Arboledas GP, Roselló AL, Alarcó MC, Safort MM. Trastornos respiratorios obstructivos del sueño en las pressões aéreas nos niños. *Epidemiología. Factores de riesgo y factores genéticos. Acta Otorrinolaringol Esp.* 2010; 61(Supl 1):7-13.
8. Arnardóttir H, Thorsteinsson H, Karlsson KÆ. Dynamics of sleep-wake cyclicity at night across the human lifespan. *Front Neurol.* 2010;1:156: 1-8.
9. Aschoff J. Editor. *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Vol 4 – Biological Rhythms. Plenum Press, New York, 1981.
10. ASDA - American Sleep Disorders Association. International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual. Rochester, MN: American Sleep Disorders Association, 1990.

11. ASDC - Association of Sleep Disorders Centers, Sleep Disorders Classification Committee, Roffwarg HP. Diagnostic classification of sleep and arousal disorders. *Sleep* 1979; 2:1-137.
12. Bao G, Guilleminault C. Obstrutive sleep apnea syndromes. In: *Clinical Neurophysiology of Sleep Disorders*. Volume 6 Edit. Christian Guilleminault. *Handbook of Clinical Neurophysiology*. Series Editors JR Daube, F Mauguière. Pp. 191-206, 2005. Elsevier, Amsterdam.
13. Battagel JM, Johal A, Kotecha B. A cephalometric comparison of subjects with snoring and obstructive sleep apnoea. *Eur J Orthod*. 2000; 22(4):353-65.
14. Battagel JM, L'Estrange PR. The cephalometric morphology of patients with obstructive sleep apnoea (OSA). *Eur J Orthod*. 1996; 18(6):557-69
15. Behrends J, Prank K, Dogu E, Brabant G. Central nervous system control of thyrotropin secretion during sleep and wakefulness. *Hormone Research*. 1998; 49 (3-4):173-177.
16. Bhattacharjee R, Kheirandish-Gozal L, Pillar G, Gozal D. Cardiovascular Complications of Obstructive Sleep Apnea Syndrome: Evidence from Children. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2009; 51 (5): 416-433.
17. Bonsignore M, McNicholas W, Montserrat J, Eckel J. Adipose tissue in obesity and obstructive sleep apnoea. *The European Respiratory Journal*. 2012; 39(3):746-767.
18. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1973; 1(7809):904-7
19. Brunetti L, Francavilla R, Leonardo Miniello V, Leone M, Rana M, Colazzo D, et al. Influence of HLA antigens and OSAS in childhood: a preliminary report. *J Sleep Res* 2005; 14: 157-62.
20. Burwell Cs, Robin ED, Whaley RD, Bickelmann AG. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation. A pickwickian syndrome. *Am J Med* 1956; 21: 811-818.
21. Campalani E1, Allen MH, Fairhurst D, Young HS, Mendonca CO, Burden AD, Griffiths CE, Crook MA, Barker JN, Smith CH. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *Br J Dermatol*. 2006;154(2):345-52
22. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia MA, Martinez M, Duran-Cantolla J, de la Peña M, Masdeu MJ, Gonzalez M, Felix del Campo F, Gallego I, Marin JM, Barbe F,

- Montserrat JM, Farre R. Cancer Incidence in a Large Multicenter Spanish Cohort. *Am J Respir Crit Care* 2013; 187 (1): 99–105.
23. Carskadon MA, Dement WC. Normal Human Sleep: An Overview. Chapt2. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Edited by H Kryger, T Roth, WC Dement. 2nd Ed. Pp. 16-25. 1994. WB Saunders Company, Philadelphia.
 24. Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. *Curr Genom* 2009; 10 (2): 119-26.
 25. Ching-Chun L, Chao-Chien H, Jau-Der H, Hung-Wen C, Herng-Ching L. Obstrutive Sleep Apnea and Increased Risk of Glaucoma: A population-based matched-cohort study. *Ophtalmology* 2013; 120 (8):1559-1564.
 26. Christensen AS, Clark A, Salo P, Nymann P, Lange P, Prescott E, Rod NH. Symptoms of sleep disordered breathing and risk of cancer: a prospective cohort study. *Sleep* 2013; 36(10):1429-1435
 27. Cillo JE Jr, Thayer S, Dasheiff RM, Finn R. Relations between obstructive sleep apnea syndrome and specific cephalometric measurements, body mass index, and apnea-hypopnea index. *J Oral Maxillofac Surg.*2012; 70(4):278-83.
 28. Cosentino F, Bosco P, Drago V, Prestianni G, Lanuzza B, Iero I, Tripodi M, Spada R, Toscano G, Caraci F, e Ferri, R. The APOE epsilon4 allele increases the risk of impaired spatial working memory in obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2008;9:831-839.
 29. Costa e Sousa RA, Santos Gil NA. Craniofacial skeletal architecture and obstrutive sleep apnoea. *J Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2013; 41:740-746.
 30. Coughlin S, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PMA, Wilding JPH. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *European Heart J* 2004; 25: 735–741
 31. de Sousa AGP, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Complications of Obesity: Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obesity Reviews* 2008; 9 (4):340–354
 32. Decker MJ, Haaga J, Arnold JL, Atzberger D, Strohl KP. Functional electrical stimulation and respiration during sleep. *J Appl Physiol.*1993;75(3):1053-61.
 33. Dement WC. History of Sleep Physiology and Medicine. Chapt1. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Edited by H Kryger, T Roth, WC Dement. 2nd Ed. Pp. 3-15. 1994. WB Saunders Company, Philadelphia.

34. Dement, W. and Kleitman, N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. *Electroenceph clin Neurophysiol.*, 1957; 9: 673-690.
35. Do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, Reis L, Myatt J, e Galvão-Teles A. 'Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005', *Obesity Reviews: An Official Journal Of The International Association For The Study Of Obesity*, 2008. 9, 1: 11-19.
36. Drake C., Roehrs T., Breslau N., Johnson E., Jefferson C., Scofield H., e Roth, T. The 10-year risk of verified motor vehicle crashes in relation to physiologic sleepiness. *Sleep*.2010;33:745-752.
37. Eastwood PR, Barnes M, Walsh JH, Maddison KJ, Hee G, Schwartz AR, Smith PL, Malhotra A, McEvoy RD, Wheatley JR, O'Donoghue FJ, Rochford PD, Churchward T, Campbell MC, Palme CE, Robinson S, Goding GS, Eckert DJ, Jordan AS, Catcheside PG, Tyler L, Antic NA, Worsnop CJ, Kezirian EJ, Hillman DR. Treating obstructive sleep apnea with hypoglossal nerve stimulation. *Sleep* 2011; 34(11):1479-1486
38. Egert S, Rimbach G, Huebbe P. ApoE genotype: from geographic distribution to function and responsiveness to dietary factors. *The Proceedings Of The Nutrition Society*. 2012;71(3):410-424.
39. Flemons WW, Buysse AD, Redline S, Pack A, Strohl K, Wheatley J, Young T, Douglas N, Levy P, McNicholas W, Fleetham J, White D, Schmidt-Nowarra W, Carley D, Romaniuk J. Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 1999; 22 (5): 667-689
40. Fogel RB, Malhotra A, Dalagiorou G, Robinson MK, Jakab M, Kikinis R, Pittman SD, White DP. Anatomic and physiologic predictors of apnea severity in morbidly obese subjects. *Sleep*. 2003;26(2):150-5.
41. Foley DJ, Masaki K, White L, Redline S. Relationship between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing at different ages. *JAMA* 2001;286:1447-1448.
42. Fontaine D, Briggs L, Pope-Smith B. Designing humanistic critical care environments. *Critical Care Nursing Quarterly* 2001;24(3):21-34.
43. Friedman MJ, Schnurr PP. The relationship between trauma, post-traumatic stress disorder, and physical health. In: Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY, editors.

- Neurobiological and clinical consequences of stress: From normal adaptation to post-traumatic stress disorder. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995. pp. 507–524.
44. Gami AS, Caples SM, Somers VK. Obesity and obstructive sleep apnea. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 869-94.
 45. Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnoea, metabolic syndrome, and cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 2004; 25 : 709-711
 46. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genetic epidemiology*. 1992;9:155-167.
 47. Gottlieb DJ, DeStefano AL, Foley DJ, Mignot E, Redline S, Givelber RJ, e Young T. APOE epsilon4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: the Sleep Heart Health Study. *Neurology* 2004;63:664-668.
 48. Gozal D, Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Crabtree VM. APOE epsilon 4 allele, cognitive dysfunction, and obstructive sleep apnea in children. *Neurology* 2007;69:243-249.
 49. Grigg-Damberger M, Gozal D, Marcus CL, Quan SF, Rosen CL, Chervin RD, Wise M, Picchietti DL, Sheldon SH, Iber C. The visual scoring of sleep and arousal in infants and children. *J Clin Sleep Med*. 2007; 15;3(2):201-240.
 50. Grilo A, Ruiz-Granados ES, Moreno-Rey C, Rivera JM, Ruiz A, Real LM, Sáez ME. Genetic analysis of candidate SNPs for metabolic syndrome in obstructive sleep apnea (OSA). *Gene*. 2013;521(1):150-154.
 51. Guilleminault C, Connolly SJ, Winkle RA. Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *Am J Cardiol*. 1983; 52(5):490-494.
 52. Guilleminault C, Eldridge FL, Tilkian A, Simmons FB, Dement WC. Sleep apnea syndrome due to upper airway obstruction: a review of 25 cases. *Arch Intern Med*. 1977;137(3):296-300.
 53. Guilleminault C., Chowdhuri S. Upper Airway resistance syndrome is a distinct syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000; 161: 1412-1413
 54. Guilleminault C, Eldridge FL, Simmon FB, Dement WC, Sleep Apnea Syndrome: can it induce hemodynamic changes? *West. J. Med*. 1975; 123: 7-16

55. Guilleminault C, Li KK. Maxillomandibular Expansion for the treatment of sleep-disordered breathing: preliminar report. *Laryngoscope* 2004; 114: 893-896
56. Guilleminault C, Simmons F, Motta J, Cummiskey J, Rosekind M, Schroeder J, Dement W. Obstructive Sleep Apnea syndrome and tracheostomy. Long-term follow-up experience. *Arch. Intern. Med.* 1981; 141: 985-988
57. Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC, The Sleep Apnea Syndromes. *Annu. Rev. Med.* 1976; 27: 465-484
58. Guilleminault C, Tilkian A, Eldridge FL, Simmon FB, Dement WC. Sleep Apnea Syndrome due to upper arway obstruction: a review of 25 cases. *Arch. Intern. Med.* 1977; 137: 298-300
59. Haimov I, Lavie P. Circadian characteristics of sleep propensity function in healthy elderly: a comparison with young adults. *Sleep* 1997; 20(4):294-300.
60. Halberg F and Katinas GS. Chronobiologic glossary. *International Journal of Chronobiology* 1973; 1: 31-63
61. Halberg, F, Halberg E, Barnum CP, Bittner JJ. (1959): Physiologic 24 hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. Edt. R.B. Withrow. Pp. 803-878. Publ. 55. Amer. Ass. Adv. Sci., Washington.
62. Hammoud AO, Carrell DT, Gibson M, Matthew Peterson C, Wayne Meikle A. Updates on the relation of weight excess and reproductive function in men: sleep apnea as a new area of interest. *Review. Asian Journal of Andrology* 2012; 14:77–81
63. Hans MG, Lieberman J, Goldberg J, Rozencweig G, Bellon E. A comparison of clinical examination, history, and magnetic resonance imaging for identifying orthodontic patients with temporomandibular joint disorders. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1992;101(1):54-59.
64. Hedner J, Grote L, Bonsignore M, McNicholas W, Lavie P, Parati G, Sliwinski P, Barbe´ F, De Backer W, Escourrou P, Fietze I, Kvamme JA, Lombardi C, Marrone O, Masa JF, Montserrat JM, Penzel T, Pretl M, Riha R, Rodenstein D, Saaresranta T, Schulz R, Tkacova R, Varoneckas G, Vitols A, Vrints H, Zielinski J. The European Sleep Apnoea Database (ESADA): report from 22 European sleep laboratories. *EurRespir J* 2011; 38: 635–642

65. Hedström A, Lima Bomfim I, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L, et al. Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 2014; 82: 865-72.
66. Hiestand D, Britz P, Goldman M, Phillips B. Prevalence of symptoms and risk of sleep apnea in the US population: Results from the national sleep foundation sleep in America 2005 poll. *Chest*. 2006; 130, 3, 780-786.
67. Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(5):1237-1244
68. Hochban W, Conradt R, Brandenburg U, Heitmann J, Peter JH. Surgical maxillofacial treatment of obstructive sleep apnea. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99(3):619-26;
69. Huang J, Pinto SJ, Yuan H, Katz ES, Karamessinis LR, Bradford RM, Gallagher PR, Hannigan JT, Nixon T, Ward MB, Lee YN, Marcus CL. Upper airway collapsibility and genioglossus activity in adolescents during sleep. *Sleep* 2012; 35(10):1345-1352;
70. Huang J, Liao N, Huang QP, Xie ZF. Association between tumor necrosis factor- α -308G/A polymorphism and obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(4):246-51.
71. Jasinska-Myga B, Opala G, Goetz CG, Tustanowski J, Ochudlo S, Gorzkowska A, Tyrpa J. Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level, and Parkinson disease dementia. *Arch Neurol*. 2007;64(2):261-265.
72. Javier Nieto F, Peppard PE, Young T, Finn L, Mae Hla K, Farre R. Sleep-disordered Breathing and Cancer Mortality. Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186 (2): 190–194.
73. Jennum P and Riha RL. Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *Eur Respir J* 2009; 33: 907–914.
74. Johal A, Patel SI, Battagel JM. The relationship between craniofacial anatomy and obstructive sleep apnoea: a case-controlled study. *J. Sleep Res*. 2007;16: 319–326.
75. Jordan AS, McEvoy RD. Gender differences in sleep apnea: epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 377-389.
76. Jung R, Kuhlo W. Neurophysiological studies of abnormal night sleep and the pickwickian syndrome. *Prog Brain Res* 1965; 18: 140-159.

77. Kadotani H, Kadotani T, Young T, Peppard PE, Finn L, Colrain IM, Murphy G, Mignot E. Association between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA* 2001;285:2888-2890.
78. Kalra M, Pal P, Kaushal R, Amin RS, Dolan LM, Fitz K, et al. Association of ApoE genetic variants with obstructive sleep apnea in children. *Sleep Med* 2008;9:260-265.
79. Kaparianos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *Neth J Med* 2006; 64: 280-289.
80. Kapas L, Hong L, Cady AB, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Somnogenic, pyrogenic, and anorectic activities of tumor necrosis factor- α and TNF α fragments. *Am J Physiol* 1992; 263: 708–715.
81. Kerkhof GA. Brain potentials at different time of day for morning-type and evening-type subjects [thesis]. Leiden: Leiden University; 1981.
82. Kezirian EJ, Boudewyns A, Eisele DW, Schwartz AR, Smith PL, Van de Heyning PH, de Backer WA. Electrical stimulation of the hypoglossal nerve in the treatment of obstructive sleep apnea. *Sleep Med Rev.* 2010;14(5):299-305
83. Khan F, Walsh C, Lane S, Moloney E. Sleep Apnoea and its Relationship with Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, and other Morbidities. *The Irish Medical Journal.* 2009; 107(1), 6-8..
84. Kheirandish L, Row BW, Li RC, Brittian KR, Gozal D. Apolipoprotein E-deficient mice exhibit increased vulnerability to intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits. *Sleep* 2005;28:1412-1417.
85. Kim TW, Jeong J, Hong S. The Impact of Sleep and Circadian Disturbance on Hormones and Metabolism. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 591729, 9 pages.
86. Kuna ST, Remmers JE. Neural and anatomic factors related to upper airway occlusion during sleep. *Med Clin North Am* 1985; 69(6):1221-1242.
87. Larkin EK, Patel SR, Goodloe RJ, Li Y, Zhu X, Gray-McGuire C, Adams MD, Redline S. A Candidate Gene Study of Obstructive Sleep Apnea in European Americans and African Americans. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:947–953.
88. Larkin EK, Patel SR, Redline S, Mignot E, Elston RC, Hallmayer J. Apolipoprotein E and obstructive sleep apnea: evaluating whether a candidate gene explains a linkage peak. *Genetic epidemiology.* 2006;30:101-110.

89. Lavie P. Who was the first to use the term pickwickian in connection with sleep patients? History of sleep apnea syndrome. *Sleep Medicine Review* 2008; 12 (1) 5-17.
90. Lee SH, Kim CH, Ahn JH, Kang JH, Kim KH, Song JS, Park SH, Moon HS, Choi HB, Kim TG, Choi YM. Analysis of HLA in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Tuberc Resp Dis* 2005; 59: 298-305.
91. Liu C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews. Neurology*. February 2013;9(2):106-118.
92. Löfstrand-Tideström B, Hultcrantz E. Development of craniofacial and dental arch morphology in relation to sleep disordered breathing from 4 to 12 years. Effects of adenotonsillar surgery. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2010; 74:137-143
93. Lumeng JC, Chervin RD. Epidemiology of Pediatric Obstructive Sleep Apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5:242-52.
94. Gasa M, Salord N, Fortuna AM, Mayos M, Vilarrasae N, Dorca J, Montserrat JM, Bonsignore MR, Monasterio C. Obstructive sleep apnoea and metabolic impairment in severe obesity. *Eur Respir J*. 2011, Vol. 38:1089-1097.
95. Maehlen MT, Provan SA, de Rooy DP, van der Helm-van Mil AH, Krabben A, Saxne T, Lindqvist E, Semb AG, Uhlig T, van der Heijde D, Mero IL, Olsen IC, Kvien TK, Lie BA. Associations between APOE genotypes and disease susceptibility, joint damage and lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2013 17;8(4):e60970.
96. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(3):207-17.
97. Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2002;360:237-245.
98. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365: 1046-1053
99. Martins da Silva A. Actividade epileptiforme interictal e ritmos biológicos. Tese de Doutorado. Universidade do Porto, Porto, 1986.
100. Martins-da-Silva A, Lopes J, Ramalheira J, Carvalho C, Cunha D, Costa P, et al. Utilidad de la caracterización genética de la narcolepsia y la hipersomnia en la definición del fenotipo: estudio en pacientes portugueses. *Rev Neurol* 2014; 58: 49-54.

101. McNicholas WT, Bonsignore MR, The Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 2007; 29 : 156-178
102. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting ADN from human nucleated cells. *NucleicAcidsRes* 1988; 16: 1215.
103. Miyagawa T1, Honda M, Kawashima M, Shimada M, Tanaka S, Honda Y, Tokunaga K. Polymorphism located in TCRA locus confers susceptibility to essential hypersomnia with HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 haplotype. *J Hum Genet.* 2010 Jan;55(1):63-5.
104. Miyao E, Miyao M, Ohta T, Okawa M, Inafuku S, Nakayama M, Goto S. Differential diagnosis of obstructive sleep apnea syndrome patients and snorers using cephalograms. *Psychiatry and Clinical Neurosciences.* 2000; 54: 659–664
105. Muzumdar H, Arens R. Central Alveolar HypoventilationSyndromes. *Sleep Med Clin.* 2008; 3(4): 601–615
106. Netzer N, Stoohs R, Netzer C, Clark K, Strohl K. Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. *Annals of Internal Medicine.* 1999;131(7):485-491.
107. Nikodemova M, Finn L, Mignot E, Salzieder N, Peppard PE. Association of sleep disordered breathing and cognitive deficit in APOE epsilon4 carriers. *Sleep* 2013,36:873-880.
108. Niu W, Guo X, Su Y, Qiu C. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor gene polymorphisms in dyslipidemias-associated essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007; 21(4):337-339.
109. O'Hara R, Luzon A, Hubbard J, Zeitzer JM. Sleep apnea, apolipoprotein epsilon 4 allele, and TBI: mechanism for cognitive dysfunction and development of dementia. *Journal of rehabilitation research and development* 2009; 46:837-850.
110. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific promoters (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 5: 225-235.
111. Opp M, Kapas L, Toth LA. Cytokine involvement in the regulation of sleep. *Proc Soc Exp Biol Medical* 1992; 201: 16–27.

112. Osorio RS, Ayappa I, Mantua J, Gumb T, Varga A, Mooney AM, Burschtin O, Taxin Z, During E, Spector N, Biagioni M, Pirraglia E, Lau H, Zetterberg H, Blennow K, Lu S, Mosconi L, Glodzik L, Rapoport D, de Leon M. Interaction between sleep-disordered breathing and apolipoprotein E genotype on cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in cognitively normal elderly individuals. *Neurobiol Aging* 2014;35:1318-1324
113. Ott J,. Analysis of human genetic linkage. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press. 1999.
114. Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin E, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, Redline, S. A whole-genome scan for obstructive sleep apnea and obesity. *Am J Hum Genet* 2003;72:340-350.
115. Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 135 (2-3): 187-205.
116. Parish J. Genetic and immunologic aspects of sleep and sleep disorders. *Chest* 2013; 143: 1489-99.
117. Parmeggiani PL. Hypothalamic homeothermy across the ultradian sleep cycle. *Arch Ital Biol.* 1995 Dec;134(1):101-7. Review.
118. Parmeggiani P L, Zamboni G, Perez E, Lenzi P. Hypothalamic temperature during desynchronized sleep. *Experimental Brain Research*, 1984; 54(2), 315-320.
119. Patel SR, Goodloe R, De G, Kowgier M, Weng J, Buxbaum SG, Cade B, Fulop T, Gharib SA, Gottlieb DJ, Hillman D, Larkin EK, Lauderdale DS, Li L, Mukherjee S, Palmer L, Zee P, Zhu X, Redline S. Association of genetic loci with sleep apnea in European Americans and African-Americans: the Candidate Gene Association Resource (CARE). *PLoS One*. 2012;7(11):e48836.
120. Pellegrino R, Mazzotti DR, Guindalini C, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S. Apolipoprotein E polymorphisms and sleep quality in obstructive sleep apnea syndrome. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry*.2011;412:2223-2227.
121. Penzel T, Kesper K. Physiology of Sleep and Dreaming. In Randerath WJ, Sanner BM, Somers VK (Eds). *Sleep Apnea. Prog Respir Res.* Basel, Karger, 2006, vol. 35, pp 13-20
122. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *Jama* 2000; 284 (23) :3015–3021.

123. Perogamvros L, Dang-Vu TT, Desseilles M and Schwartz S. Sleep and dreaming are for important matters. *Front. Psychol.* 2013;4:474 (4):1-15.
124. Perri RA, Kairaitis SK, Wheatley JR, Amis TC. Anthropometric and craniofacial sexual dimorphism in obstructive sleep apnea patients: is there male–female phenotypical convergence? *J Sleep Res* 2014; 24: 82–9.
125. Pillar G. and Lavie P. "Assessment of the Role of Inheritance in Sleep Apnea Syndrome", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 151, No. 3 (1995), pp. 688-691.
126. Platt B, Riedel G. The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav Brain Res.* 2011; 221(2):499-504.
127. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1993;342(8873):697-9.
128. Prachartam N, Hans MG, Strohl KP, Redline S. Upright and supine cephalometric evaluation of obstructive sleep apnea syndrome and snoring subjects. *Angle Orthod* 1994; 64 (1): 63-74
129. Procaccini C, Carbone F, Galgani M, La Rocca C, De Rosa V, Cassano S, Matarese G. Obesity and susceptibility to autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 287-294.
130. Punjabi NM, Polotsky VY. Disorders of glucose metabolism in sleep apnea. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1998–2007.
131. Qaseem A, Holty J-E C, Owens DK, Dallas P, Starkey M, Shekelle P, for the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Management of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Clinical Practice. Guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2013;159:471-183.
132. Raber J. AR, apoE, and cognitive function. *Horm Behav.* 2008 May;53(5):706-15.
133. Rechtschaffen A. and Kales A., Editors. A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects. BIS/BRI UCLA, 1968. Los Angeles, CA.
134. Redline S, Tishler P. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev* 2000; 4: 583-602.
135. Redline S, Tishler PV, Tosteson TD, Williamson J, Kump K, Browner I, Ferrette V, Krejci P. The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:682-7.

136. Riha RL and McNicholas WT. The genetic and cardiovascular aspects of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *EurRespir J* 2009; 33: 233–236.
137. Riha RL, Brander P, Vennelle M, Douglas NJ. A cephalometric comparison of patients with the sleep apnea/hypopnea syndrome and their siblings. *Sleep*. 2005 28(3):315-20.
138. Riha RL, Gislason T and Diefenbach K. The phenotype and genotype of adult obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *EurRespir J* 2009; 33: 646–655.
139. Riha RL. Genetic Aspects of the Obstructive Sleep Apnoea/Hypopnoea Syndrome Is There a Common Link with Obesity? *Respiration* 2009; 78: 5–17.
140. Roedig J, Phillips B, Morford L, Van Sickels J, Falcao-Alencar G, Fardo D, Hartsfield J, Ding X, Kluemper G. Comparison of BMI, AHI, and apolipoprotein E epsilon4 (APOE-epsilon4) alleles among sleep apnea patients with different skeletal classifications. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2014;10:397-402
141. Saarelainen S, Lehtimäki T, Kallonen E, Laasonen K, Poussa T, Nieminen MM. No relation between apolipoprotein E alleles and obstructive sleep apnea. *Clinical genetics*. 1998;53:147-148.
142. Sanders M, Redline S. Obstructive Sleep Apnea/Hypopnea Syndrome. *Current Treatment Options In Neurology*. 1999;1(4):279-290.
143. Schmid SM, Hallschmid M, Schultes B. (2014) The metabolic burden of sleep loss. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015; 3(1):52-62
144. Schotland HM, Insko EK, Schwab RJ. Quantitative Magnetic Resonance Imaging Demonstrates Alterations Of The Lingual Musculature In Obstructive Sleep Apnea. *Sleep* 1999; 22(5): 605-613
145. Severinghaus J, Mitchell R. Ondine's curse: failure of respiratory center automaticity while awake. *Clin Res* 1962;10:122.
146. Silber MH, Ancoli-Israel S, Bonnet MH, Chokroverty S, Grigg-Damberger MM, Hirshkowitz M, Kapen S, Keenan SA, Kryger MH, Penzel T, Pressman MR, Iber C. The visual scoring of sleep in adults. *J Clin Sleep Med* 2007; 15, 3(2):121-31. Erratum in *J Clin Sleep Med*. 2007;15, 3(5):table of contents.

147. Simola P, Liukkonen K, Pitkäranta A, Pirinen T, Aronen E. Psychosocial and somatic outcomes of sleep problems in children: a 4-year follow-up study. *Child: Care, Health & Development*. January 2014;40(1):60-67.
148. Smith P, Gold A, Meyers D, Haponik E, Bleecker E. Weight loss in mild to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 1985; 103: 850-855.
149. Solow B, Ovesen J, Nielsen PW, Wildschjødtz G, Tallgren A. Head posture in obstructive sleep apnoea. *Eur J Orthod*. 1993;15(2):107-114.
150. Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N Engl J Med* 1993; 328:303-307.
151. Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet*. 1999; 354 (9188):1435-1439.
152. Steriade M. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience*. 2006;137(4):1087-1096.
153. Strohl KP, Saunders NA, Feldman NT, Hallett M. Obstructive sleep apnea in family members. *N Engl J Med* 1978; 299:969-973.
154. Tangugsorn V, Krogstad O, Espeland L, Lyberg T. Obstructive sleep apnoea: multiple comparisons of cephalometric variables of obese and non-obese patients. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2000; 28: 204-212
155. Tarasiuka A, Reuveni H. The Economic Impact of Obstructive Sleep Apnea. *Curr Opin Pulm Med*. 2013; 19(6):639-644
156. Terwilliger JD, Ott J, 1994. *Handbook of human genetic linkage*. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press.
157. Thakre TP, Mamtani MR, Kulkarni H. Lack of association of the APOE epsilon 4 allele with the risk of obstructive sleep apnea: meta-analysis and meta-regression. *Sleep*. 2009; 32:1507-1511.
158. Uyrum E, Balbay O, Annakkaya AN, Gulec Balbay E, Silan F, Arbak P. The relationship between obstructive sleep apnea syndrome and apolipoprotein E genetic variants. *Respiration* 2015, 89:195-200.
159. Van Cauter E, Leproult R, Plat L. Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *Jama: Journal of The American Medical Association*. 2000; 284(7): 861-868.

160. Van de Heyning PH, Badr MS, Baskin JZ, Cramer Bornemann MA, De Backer WA, Dotan Y, Hohenhorst W, Knaack L, Lin HS, Maurer JT, Netzer A, Odland RM, Oliven A, Strohl KP, Vanderveken OM, Verbraecken J, Woodson BT. Implanted upper airway stimulation device for obstructive sleep apnea. *Laryngoscope*. 2012; 122(7):1626-1633.
161. Varvarigou V, Dahabreh IJ, Malhotra A, Kales SN. A review of genetic association studies of obstructive sleep apnea: field synopsis and meta-analysis. *Sleep* 2011; 34:1461-1468.
162. Veldi M, Ani R, Vaheer H, Eller T, Hion T, Aluoja A, Vasar V- Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS): Pathophysiology in Estonians. *Pathophysiology* 17. 2010; 219–223.
163. Vgontzas A, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas, A, Lin HM, Kales A, Chrousos GP. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1151–1158.
164. Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 211–224
165. Vilhena EM, Paiva I, Rodrigues H, Martins da Silva A, Mendonça D. Variaciones fisiológicas de los potenciales cerebrales auditivos ERP300 en adultos jóvenes. Análisis secuencial. *Rev Neurol* 2005;41:633-635
166. Wallace A, Bucks RS. Memory and obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep* 2013;36(2):203-220
167. Webb WB, Dube MG. Temporal Characteristics of Sleep. Chapt 26 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4 – Biological Rhythms. Edit. Jürgen Aschoff, Plenum Press, New York, 1981, Pp.:499-522
168. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*. 1982;257(5):2518-2521.
169. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*. 1981; 256(17):9077-9083.
170. Weitzman ED, Moline ML, Czeisler CA, Zimmerman JC. Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurobiol Aging* 1982; 3(4):299-309.

171. WHO. Obesity and overweight. [Online] World Health Organization, August 2014. [Cited: December 11, 2014.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Fact sheet N°311.
172. Wyatt JK, Ritz-De Cecco A, Czeisler CA, Dijk D-J. Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day. *Am J Physiol* 1999; 277 (4): 1152:1163
173. Xu H, Qian Y, Guan J, Yi H, Yin S. No association between the ApoE epsilon2 and epsilon4 alleles and the risk of obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep* 2015, 3:313-318.
174. Yoshizawa T, Akashiba T, Kurishina K, Otsuka K, Horie T. Genetics and obstructive sleep apnoea syndrome: a study of HLA typing. *Intern Med* 1993; 32: 94-97.
175. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Bader S. The occurrence of sleep disordered breathing in middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328:1230-1235
176. Young T, Peppard P, Gottlieb D. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002; 165(9):1217-1239.
177. Young T, Peppard P, Taheri S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1592-1599.
178. Yuan H, Schwab RJ, Kim C, He J, Shults J, Bradford R, Huang J, Marcus CL. Relationship between body fat distribution and upper airway dynamic function during sleep in adolescents. *Sleep* 2013; 36(8):1199-1207
179. Zamboni G, Perez E, Amici R, Jones CA, Parmeggiani PL. Control of REM sleep: an aspect of the regulation of physiological homeostasis. *Arch Ital Biol*. 1999;137(4):249-262.
180. Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm*. 2011; vol. 2011, 949072, 10 pages.
181. Zisapel N. Sleep and sleep disturbances: biological basis and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 64. 2007; 10: 1174–1186.



8. *Capítulo 8.* ANEXOS



8.1. CONSENTIMENTO INFORMADO



Estudos de investigação
Modelo de Consentimento Informado



CONSENTIMENTO INFORMADO¹

**Determinantes genéticos implicados na patofisiologia do
síndrome da apneia obstrutiva de sono**

Eu, abaixo-assinado _____

Fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina **a avaliar a existência de alterações genéticas que podem estar implicadas no aparecimento das doenças do sono (nomeadamente na patofisiologia do síndrome da apneia obstrutiva de sono)**.

Sei que neste estudo está prevista a realização de exames, tendo-me sido explicado em que consistem e quais os seus possíveis efeitos.

Sei que uma parte do sangue vai ser utilizada de imediato para fazer algumas análises e que outra parte vai ser armazenada para ser utilizada posteriormente.

Também sei que algumas análises não podem ser efectuados neste hospital e que, por isso, têm que ser realizadas noutras instituições, nomeadamente no ICBAS e no Instituto Gulbenkian de Ciência.

Sei ainda que alguns dos estudos que vão ser efectuados são estudos genéticos²

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima.

Concordo que sejam efectuados os exames e a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do participante no estudo.

Assinatura ----- Data [Ano/mês/dia].

Nome do médico responsável

Assinatura ----- Data [Ano/mês/dia].

¹ Este modelo de consentimento informado deve ser adaptado a cada estudo em particular, acrescentando outros dados considerados pertinentes ou eliminando partes não aplicáveis. Se oportuno, deve ser anexada cópia do folheto informativo sobre o estudo.

² Os estudos genéticos devem estar de acordo com o estabelecido no Decreto Lei 12 / 2005, de 26 de Janeiro.

8.2. INQUÉRITO

Código do paciente _____

1. Idade?

- ☐ < 20 ANOS
- ☐ 20-29 ANOS
- ☐ 30-39 ANOS
- ☐ 40-49 ANOS
- ☐ 50-59 ANOS
- ☐ 60-69 ANOS
- ☐ > 70 ANOS

2. Sexo?

- ☐ Feminino
- ☐ Masculino

3. Naturalidade: _____

4. Qual é o seu peso? _____ Kg

5. Qual é a sua altura? _____ cm

6. Fuma:

- a. SIM
- b. Não
- c. Se sim, quantos cigarros por dia:
 - i. < 10
 - ii. 10-20
 - iii. > 20

7. Profissão?

Quadro Superior.....	Profissão Intelectual e científica.....
Profissionais Intermédios.....	Administrativo e similar.....
Serviços e Vendedores.....	Agricultura e Pescas.....
Operários e Artífices.....	Operadores de máquinas.....
Trabalhador não qualificado.....	Estudante.....

8. Alguma vez efectuou tratamento de correcção ortodôntica/Cirurgia ortognática?

- a. SIM
- b. Não
- c. Se sim, há quanto tempo efectuou esse tratamento:
 - i. < 1 ano
 - ii. 1-3 anos
 - iii. > 3 anos

9. Alguma vez efectuou cirurgia às amígdalas?

- a. SIM
- b. Não
- c. Se sim, há quanto tempo efectuou esse tratamento:
 - i. < 1 ano
 - ii. 1-3 anos
 - iii. > 3 anos

10. Tem alguma patologia de Sono?

- a. SIM
- b. Não
- c. Se sim, há quanto tempo sabe da sua existência:
 - i. < 6 meses
 - ii. 6- 12 meses
 - iii. 1 – 3 anos
 - iv. > 3 anos

11. Existe história na sua família de doenças do Sono?

- a. SIM
- b. Não
- c. Se sim, quem: _____

12. Tem alguma incapacidade ou doença crónica:

- ☐ Sim
- ☐ Não

Se sim, por favor especifique _____

13. A que horas usualmente acorda em dias de trabalho?

14. Qual é a **principal razão** que faz com que usualmente acorde a estas horas em dias de trabalho?

- ☐ Barulho ou os meus animais de companhia acordam-me.
- ☐ Despertador.
- ☐ O meu conjugue ou outros membros da família.
- ☐ Preciso de ir à casa de banho.
- ☐ Não sei, simplesmente acordo.
- ☐ Outra _____
- ☐ Quanto tempo dorme numa noite normal em tempo de trabalho. [Não inclua o tempo que passa acordado na cama antes de adormecer]. _____ horas _____ minutos
- ☐ Nos dias de trabalho, depois de ir para a cama à noite, usualmente quanto tempo leva até adormecer? _____ minutos

8.3. PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES DERIVADAS DESTA TESE

8.3.1. Publicações científicas em revistas peer reviewed

ORIGINAL

Obstructive sleep apnoea syndrome and HLA in the North of Portugal

Luís Silva, João Lopes, João Ramalheira, Daniela Cunha, Cláudia Carvalho, Andreia Bettencourt, Sandra Brás, Paulo Costa, M. Berta Silva, António Martins-da-Silva

Introduction. The obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is a common, complex and polygenic disease with diverse aetiologies interacting to produce a single phenotype. OSAS occurs throughout the entire lifespan and familial aggregation has been suggested. Several predisposing factors, as age, gender and obesity have been described. Associations between HLA polymorphisms and sleep disorders are confirmed, in European and Non-European descendent populations. However the associations found between HLA alleles and OSAS have not been consistent and have no informative value for sleep disorder classification.

Aims. To explore the genetic association of HLA with OSAS in a northern Portuguese population and to evaluate the role of obesity in the context of HLA in OSAS.

Patients and methods. A cohort of 131 patients with OSAS was studied. Patients followed up in an Outpatient Sleep Clinic were assessed by clinical history, night sleep polygraphic recording, multiple sleep latency test (when necessary for differential diagnosis), laboratorial and demographic studies. A control population (CP) of 223 healthy individuals was used for comparison. HLA-DRB1 genotyping was performed using a polymerase chain reaction with sequence specific primers methodology.

Results. In this cohort, the HLA-DRB1*03 allele was identified as a susceptibility factor for OSAS (24% OSAS vs. 15% CP; $p = 0.025$; odds ratio = 1.861; 95% CI = 1.081-3.205). No significant differences were found for other HLA-DBR1* alleles.

Conclusion. HLA-DRB1*03 is a susceptibility factor for OSAS in Portuguese population.

Key words. Gender. HLA-DRB1*03. Obesity. Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS). Risk factors. Sleep disorders.

Introduction

Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is a common but complex and polygenic disease with various predisposing factors interacting to produce a single phenotype [1-4]. The clinical features are the repetitive episodes of total (apnoea) or partial (hypopnoea) upper airway obstruction that occur during sleep even though respiratory effort is still present [5,6]. The severity of OSAS is quantified by an Apnoea-Hypopnoea Index (AHI), referring to the number of apnoea or hypopnoea episodes per hour. It is considered relevant if five or more episodes occur. Patients frequently present loud and habitual snoring, witnessed apnoea, un-refreshing sleep and excessive daytime sleepiness [5].

OSAS occurs throughout the entire lifespan [1] and in western countries affects approximately 2-4% of males and 1-2% of females in the middle-aged population (40-60 years-old) [2,5,7]. In postmenopausal women (especially in those without hormone replacement) this prevalence increases,

although it remains lower than in men in the same age range [2,8]. The American Academy of Sleep Medicine, point values of 3-7% of adult men and 2-5% of women suffering of OSAS [5]. The disorder is frequently unrecognized and undiagnosed, because patients interpret their symptoms as a normal manifestation of poor lifestyle.

Several predisposing factors namely obesity, but also age and gender, have been implicated in this syndrome. Anatomical alterations of bone or soft tissues from craniofacial structures (nasal, mouth, or oropharynx) and other conditions associated with nasal obstruction frequently contribute to OSAS. Upper airway calibre restrictions are a result of multiple factors [5,6]. Such diverse factors influence the AHI, oxy-haemoglobin desaturation and hypercapnia, common consequences of this complex disorder [1,5,7,9].

Obesity and overweight do influence risk and OSAS severity. According to the World Health Organization obesity is a common ('endemic') disease in developed countries [10] and represents a risk to

CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (L. Silva). Serviço de Neurofisiologia; Departamento de Neurociências; Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto (J. Lopes, J. Ramalheira, D. Cunha, A. Martins-da-Silva). Laboratório de Imunogenética; Departamento de Patologia e Imunologia Molecular; Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto (D. Cunha, C. Carvalho, A. Bettencourt, S. Brás, M.B. Silva). Unidad Multidisciplinar de Investigación Biomédica; Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto (C. Carvalho, A. Bettencourt, P. Costa, M.B. Silva, A. Martins-da-Silva). Departamento de Genética Humana; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (P. Costa). Porto, Portugal.

Corresponding author: Prof. Dr. António Martins da Silva. Serviço de Neurofisiologia. Departamento Neurociências. Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto. Largo Professor Abel Salazar. 4099-001 Porto, Portugal.

E-mail: ams@icbas.up.pt

Accepted: 18.06.15.

How to cite this paper: Silva L, Lopes J, Ramalheira J, Cunha D, Carvalho C, Bettencourt A, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome and HLA in the North of Portugal. Rev Neurol 2015; 61: 301-7.

Versión española disponible en www.neurologia.com

© 2015 Revista de Neurología

health due to the associated morbidity and mortality [10,11]. Obesity and overweight are referred to the Body Mass Index (BMI). BMI is calculated as a function = Weight (kg) / [Height (m)]². The cut-off for an overweight person is a BMI between 25.0 and 29.9 and for an obese person is BMI \geq 30 [10,11]. Obesity increases the risk of OSAS [3]. In contrast, weight loss may reduce the severity of this condition [3,12].

In terms of identifying causal genes to OSAS, several genome linkage analyses and candidate gene association studies have been performed [13, 14]. The heterogeneity of clinical OSAS phenotypes difficult the identification of causal genes [4]. Familial aggregation [9] and inherited factors account for approximately 40% of the risk of OSAS [1,3], but is unlikely that a single genetic factor exists. As obesity is a strong predisposing factor for OSAS the analysis of genetic markers could be biased. Therefore genetic studies on OSAS should distinguish between patients with and without obesity.

One of the most reported genetic association studies in sleep disorders has been with the major histocompatibility complex (MHC), in humans known as human leukocyte antigen (HLA). The HLA is a genetic marker that may be implicated in the pathogenesis of a disease *per se* or through a gene located in the same region (MHC) that may contribute to disease susceptibility/protection. The first description of the association between HLA polymorphisms and sleep disorders was reported in Japanese patients. The association between narcolepsy and HLA-DR2 was presented in 1983 [15] and the results published by the same group in 1984 [16]. Later, it was discovered that the HLA-DQB1*06:02 allele, rather than the HLA-DR2 antigen is a better marker for narcolepsy across all ethnic groups [17,18]. In some populations, 90-100% of patients with type 1 narcolepsy carry this allele, often in combination with HLA-DRB1*15:01 (HLA-DR2), which are in full linkage disequilibrium [19]. Studies of microsatellites in the HLA-DQ region indicate that the susceptibility factor is located in this region [20]. Individuals homozygous for the HLA-DQB1*06:02 allele have an increased risk (2-3 times) to develop narcolepsy. Heterozygotes for DQB1*06:02 in combination with other HLA class II alleles (including DQB1*03:01, DQA1*06, DRB1*04, DRB1*08, DRB1*11 and DRB1*12) are also at risk. It has also been recognized that several HLA-DQB1* alleles (non-HLA-DQB1*06:02) act as protective factors [21,22].

However the association of HLA alleles/antigens with OSAS is much less clear [23]. In 2005, Brunetti et al reported in a southern Italy population [24],

that HLA-A*33, DRB1*03 and DQB1*02 were significantly more frequent in patients with OSAS than in healthy individuals. However, this significance was lost after Bonferroni's multiple testing corrections [24]. A study carried out in Korean patients [25] revealed an association between OSAS and HLA-A*11 and DRB1*09 genes. The HLA-A*11 allele frequency was significantly lower in patients with OSAS (acting as a protective factor) and the HLA-DRB1*09 allele frequency was higher when compared with controls (acting as a susceptible factor). They also stressed that HLA-DRB1*08 allele is associated with disease severity [25]. More recent studies show changes on the ratio of electroencephalographic sleep waves frequencies in HLA-DQB1*06:02 positive OSAS patients, opening the discussion about the role of HLA alleles in the sleep structure [26].

The present study aims to contribute to the discussion of the reported differences on HLA frequencies found in OSAS patients by analysing such frequencies in an unselected and well-controlled OSAS population from the North of Portugal. We also investigate if such frequencies were independent from possible confounders represented by the two most common OSAS risk factors: obesity and gender.

Patients and methods

Study population

A random cohort of 371 patients (253 males and 118 females) complaining of diverse sleep disturbances, assessed consecutively at the Sleep Outpatient Clinic of Hospital Santo António/CHP-Porto (a tertiary hospital in the North of Portugal) was enrolled in this study.

Patients were evaluated by means of clinical history, physical and neurological evaluation, night sleep polygraphic EEG-video recording, that included EEG, EOG, EMG –chin and lower limbs–, nasal and mouth ventilation and thoracic respiratory effort, O₂ saturation, EKG, and snoring. Additionally, for patients with suspicion of narcolepsy type 1 or type 2 and for hypersomnia, subsequent multiple sleep latency test (MSLT) was performed the day after night registration. A blood venous sample, for laboratory studies, was collected in the same day of sleep night registration. The study was approved by the Hospital Ethical Committee.

The medical records were reviewed by the participating clinicians and confirmed by the study coordinator. Patients were then classified according to

Table I. Demographic characteristics of obstructive sleep apnoea syndrome patients.

	All patients			Male			Female		
	<i>n</i>	%	Mean	<i>n</i>	%	Mean	<i>n</i>	%	Mean
Number of patients	131	—	—	114	87.0	—	17	13.0	—
Age (years)	—	—	55.1	—	—	55.0	—	—	55.5
Patients with age < 50 years	38	29.0	40.9	34	29.8	40.6	4	23.5	43.2
Patients with age ≥ 50 years	93	71.0	60.9	80	70.2	61.2	13	76.5	59.2
BMI (kg/m ²)	127 ^a	—	29.4	110	—	29.4	17	—	29.9
Patients with BMI < 30	77	60.6	26.4	68	61.8	26.6	9	52.9	24.7
Patients with BMI ≥ 30	50	39.4	34.2	42	38.2	33.9	8	47.1	35.7

BMI: Body Mass Index. ^aInformation is not available for four patients.

the International Classification of Sleep Disorders –Third Edition (ICSD3) criteria [5]. From the initial cohort, 131 subjects (35.3%) exhibited OSAS (AHI > 5) –114 males and 17 females. The remaining cohort (*n* = 240; 139 males and 101 females) had other sleep disorders and were considered as non-OSAS patients and include: 58 patients (41 males and 17 females) with primary snoring or snoring associated to respiratory distress with an AHI < 5; and 182 patients with other sleep disorders mainly insomnia, periodic limb movement disorders, narcolepsy, idiopathic hypersomnia or other hypersomnias. All but four OSAS patients and 142 of non-OSAS had BMI calculated. The control group (CP) comprised 223 healthy individuals clinically assessed, ethnically matched and recruited among northern Portuguese blood donors.

DNA extraction and genotyping

Peripheral blood venous samples (10 mL) from sleep patients and controls were collected in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Each subject was informed about the study and gave written informed consent for the genetic analysis.

The genomic DNA was obtained from proteinase-K treated peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [27]. DNA was amplified by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) for the identification of HLA-DRB1 genes, based on methods and primer sequences previously described [28]. PCR products were visualized under ultraviolet light after electro-

phoretic separation on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. Genotypes were deduced from the amplification patterns.

Statistical analysis

HLA-DRB1* phenotype frequencies were determined by direct counting. HLA frequencies in OSAS and non-OSAS patients and controls were compared using the Pearson chi-square test or the Fisher's exact test, as appropriate. Odds ratios (OR) and their respective 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Values of *p* < 0.05 were considered as statistically significant.

To identify further the specific alleles contributing to OSAS susceptibility, a stepwise logistic regression, on an allelic level using backward selection, was applied. Starting from a model with all HLA-DRB1 alleles, the least significant allele was removed one at the time until all remaining alleles were significant, based on the likelihood-ratio test. It should be noted that ORs obtained in a multivariate logistic regression analysis were adjusted for all the other alleles included in the model, and differ from those obtained when a given allele is compared with all other alleles. Data were analyzed using SPSS v. 21 software.

Results

The demographic characteristics of the 131 OSAS patients are summarized in table I.

Table II. HLA-DRB1* allele frequencies in Portuguese patients with obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) and in the control population.

	Controls (n = 223)	OSAS (n = 131) ^a	p	OSAS/obese (n = 50)	OSAS/non-obese (n = 77)	p
DRB1*01	48 (22%)	28 (21%)	0.973	15 (30%)	12 (16%)	0.075
DRB1*03	33 (15%)	32 (24%)	0.024	15 (30%)	16 (21%)	0.292
DRB1*04	52 (23%)	28 (21%)	0.673	10 (20%)	18 (23%)	0.827
DRB1*07	58 (26%)	38 (29%)	0.540	13 (26%)	25 (33%)	0.552
DRB1*08	19 (9%)	16 (12%)	0.261	4 (8%)	12 (16%)	0.278
DRB1*09	13 (6%)	2 (2%)	0.052	0	2 (3%)	0.519
DRB1*10	7 (3%)	3 (2%)	0.642	0	3 (4%)	0.278
DRB1*11	44 (20%)	30 (23%)	0.479	10 (20%)	19 (25%)	0.666
DRB1*12	8 (4%)	4 (3%)	0.789	2 (4%)	2 (3%)	0.646
DRB1*13	68 (30%)	31 (24%)	0.167	14 (28%)	16 (21%)	0.396
DRB1*14	14 (6%)	8 (6%)	0.949	4 (8%)	3 (4%)	0.432
DRB1*15	47 (21%)	21 (16%)	0.245	7 (14%)	14 (18%)	0.629
DRB1*16	9 (4%)	8 (6%)	0.379	3 (6%)	5 (7%)	1.000

^a Information is not available for four patients.

The distribution by gender shows that, in the OSAS cohort, the frequency of males was higher (87% males vs. 13% females). The mean age of patients was 55.1 years old and similar values were found (55 years old in males and 55.5 years old in females) in both genders. As the age peak incidence is about 50 years old we calculated the distribution of OSAS patients under and over 50 years old that is similar in both genders (males: 29.8% < 50 years old, 70.2% ≥ 50 years old; females: 23.5% < 50 years old, 76.5% ≥ 50 years old) (Table I).

To investigate the effect of HLA genetic determinants on susceptibility to OSAS, patients and controls were genotyped for HLA-DRB1*alleles (Table II). The HLA-DRB1*03 allele frequency was higher in the OSAS population when compared with controls (24% OSAS vs. 15% CP). This difference is statistically significant ($p = 0.024$; OR = 1.86; 95% CI = 1.08-3.21). For the others HLA-DRB1 alleles tested, no association was found. To verify the independence of the HLA-DRB1*03 allele relative to the presence of the other HLA alleles tested, a logistic regression analysis was carried out. The re-

sult obtained confirm the association of DRB1*03 allele with OSAS ($p = 0.025$; OR = 1.861; 95% CI = 1.081-3.205). When OSAS patients were sub grouped in obese and non-obese, no differences in HLA allele frequencies were found between the two sub groups (Table II).

In order to understand if obesity increases the risk of OSAS [5,7,27], the patient cohort was divided in two sub-groups according to BMI status (< 30 or ≥ 30) and the frequency of obesity was compared with the data published for the Portuguese population [11]. From the 127 OSAS patients in which the BMI was calculated, 39.4% were obese, and the remaining 60.6% non-obese. The percentage of obese subjects was significantly higher in the group of OSAS patients than the one reported for the general Portuguese population (39.4% vs. 14.2%; $p < 0.0001$; OR = 3.93; 95% CI = 2.74-5.63). Additionally the frequency of obesity was assessed in the subgroup of 142 non-OSAS randomly selected from the initial cohort of 371 patients, in which BMI was available. In this group, 42 patients (29.6%) were obese (BMI > 30) and 100 were not. This difference

was not statistically significant (39.4% vs. 29.6%; $p = 0.096$). To note that the percentage of obese individuals in the non OSAS subgroup was also significantly higher than the one reported for the general Portuguese population (29.6% vs. 14.2%; $p < 0.0001$; OR = 2.54; 95% CI = 1.76-3.66).

The mean value of BMI was 29.4 in males and 29.9 in females. Non-obese OSAS patients had a BMI of 26.6 in males and 24.7 in females and obese OSAS patients had a BMI 33.9 in males and 35.7 in females. To access if the presence of the DRB1*03 allele influences obesity, OSAS patients were divided in non-obese (BMI < 30) and obese (BMI ≥ 30). The frequency of this allele was lower in non-obese than in obese patients (20.8% vs. 30%, respectively), but the difference observed was not statistically significant (Table III).

Additionally we addressed the same question in the non-OSAS group. Also no statistically significant differences were observed (9.5% vs. 16%, respectively) between obese and non obese patients.

Discussion

As already stated, the main goal of the present study was to investigate the association between HLA and OSAS in patients with sleep disorders of the North of Portugal.

The demographic characteristics of Portuguese OSAS patients reproduce those of other populations [5,8] with a higher frequency of male subjects (87% males vs. 13% females; gender ratio 7:1) confirming that male gender is a general risk factor for OSAS (male/female ratio 4:1 to 10:1) [8].

It was also found that OSAS is most common in middle-aged patients, with a mean age of 55.1 years (range: 6-84 years). OSAS is known to occur in a wide age range, increasing with age, with a plateau in the elderly [5].

A significant association between the HLA-DRB1*03 allele and OSAS was demonstrated in this study (24% in OSAS vs. 15% in CP; $p = 0.025$). This association is independent of gender. These results concur with those observed by Brunetti et al in which the HLA-DRB1*03 allele is overrepresented in Italian children with OSAS (24.4% vs. 12.8%; $p = 0.03$) [24]. At present there is no answer to the question of how HLA do influence OSAS. Both results, the present study in adults and those in children [24] address such question and stimulate some discussion. As a comment for such discussion we note that OSAS in children and adults may have different pathophysiological basis. However this is

Table III. HLA-DRB1*03 prevalence in obstructive sleep apnoea syndrome patients (obese/non obese) ($n = 127$)^a.

		HLA-DRB1*03
BMI < 30	All ($n = 77$)	16 (20.8%)
	Male ($n = 68$)	13 (19.1%)
	Female ($n = 9$)	3 (33.3%)
BMI ≥ 30	All ($n = 50$)	15 (30.0%)
	Male ($n = 42$)	13 (30.9%)
	Female ($n = 8$)	2 (25.0%)

BMI: Body Mass Index. ^a Information is not available for four patients.

not true for all OSAS patients. The HLA-OSAS association found in these populations may indicate that certain individuals exhibiting such genetic characteristics are more prone to have sleep respiratory distress (OSAS). Other way to comment is based on the hypothesis stated by Riha et al, considering that 'the genotype of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome is affected by the lack of a consistent definition of the phenotype [...] at a single point in time' [1]. The concept, of individualization of a significant result at a 'single point in time' in OSAS patients may also help to understand the results obtained in different ethnic or demographic populations.

In fact, studies conducted in Asian and other European OSAS populations have shown different HLA associations. A Japanese study [29] with a cohort of 32 male subjects with OSAS, failed to demonstrate an association between HLA-DR alleles and OSAS patients. Also a Korean study [25], with 25 patients (24 males, 1 female) with OSAS, reported that HLA-DRB1*09 allele frequency was increased (23% OSAS vs. 16% CP). On the same study, the authors restricted the analysis to the most severe apnoea cases and reported an increase of the HLA-DRB1*08 allele frequency (36% in OSAS vs. 20% in CP). Our study did not support these findings. Both studies are relevant, but altogether analysed scarcely representative cohorts. It should be noted that other factors such as ethnic backgrounds or inherent demographic characteristics, the most noticeable being the gender ratio, could be implicated.

The Japanese study previously referred [29] shows that 'HLA-A2 positive patients were more obese than HLA-A2-negative patients' and 'that the high-

er incidence of OSAS in patients was due to the influence of this genetic marker on obesity' [29]. The results of this study were considered later as biased by the presence of a significantly higher number of obese individuals among the patients with OSAS when compared to controls [24]. As for other diseases the interactions between HLA genotype and BMI status are still under discussion supporting a role for HLA in obesity [30].

The prevalence of obesity (39.4%) in our cohort is almost triple than the one reported for the Portuguese population (14.2%) [11]. The obtained results show that obesity increases the risk of developing OSAS three to four times ($OR = 3.93$) in agreement with studies documenting that obesity is a common and pathogenic factor for OSAS in adults [3,5,12,31-33].

In the present study we found that OSAS is associated with HLA-DRB1*03 allele and is also associated with obesity. In order to study the possible confounder effect of obesity on OSAS alleles frequencies, we conducted a regression analysis adjusting for age, sex and BMI to clarify and avoid possible bias of the influence of this allele in obesity. The results of this analysis reinforce our conclusion that HLA-DRB1*03 is associated with OSAS and that such association is independent of obesity in this group of patients.

In conclusion, the relationship between OSAS, HLA alleles and risk factors (obesity and gender) was studied for the first time in a Portuguese population, and to the best of our knowledge is the larger cohort analysed so far. We found that HLA-DRB1*03 allele is a susceptibility factor for OSAS, and that being male and obese increases the risk for OSAS. These results need to be confirmed in other populations and in larger cohorts.

References

- Riha RL. Genetics aspects of the obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome – is there a common link with obesity? *Respiration* 2009; 78: 5-17.
- Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. *Curr Genom* 2009; 10: 119-26.
- Redline S, Tishler P. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev* 2000; 4: 583-602.
- Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. The genetics of obstructive sleep apnoea. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 536-42.
- American Academy of Sleep Medicine. *International Classification of Sleep Disorders*, third edition. Darien, IL: AASM; 2014.
- Ho M, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011; 3: e15.
- De Sousa AG, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obes Rev* 2008; 9: 340-54.
- Jordan AS, McEvoy RD. Gender differences in sleep apnea: epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 377-89.
- Parish J. Genetic and immunologic aspects of sleep and sleep disorders. *Chest* 2013; 143: 1489-99.
- World Health Organization. Obesity and overweight. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>. [11.12.2014].
- Carmo I, Santos O, Camotas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2007; 9: 11-9.
- Smith P, Gold A, Meyers D, Haponik F, Bleecker F. Weight loss in mild to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 1985; 103: 850-5.
- Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 136: 187-205.
- Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet* 2007; 8 (Suppl 1): S9.
- Honda Y, Asaka A, Tanaka Y, Juji T. Discrimination of narcoleptic patients by using genetic markers and HLA. *Book of abstracts of the 4th International APSS Congress of Sleep Research*, 1983, p. 316.
- Juji T, Satake M, Honda Y, Doi Y. HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy: All patients were DR2 positive. *Tissue Antigens* 1984; 24: 316-9.
- Mignot E, Lin X, Arrington J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J, et al. DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep* 1994; 17 (Suppl 8): S60-7.
- Martins-da-Silva A, Lopes J, Ramalheira J, Carvalho C, Cunha D, Costa P, et al. Utilidad de la caracterización genética de la narcolepsia y la hipersomnia en la definición del fenotipo: estudio en pacientes portugueses. *Rev Neurol* 2014; 58: 49-54.
- Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998; 50 (Suppl 1): S16-22.
- Ellis M, Hetisimer A, Ruddy D, Hansen S, Kronmal G, McClelland E. HLA class II haplotype and sequence analysis support a role for DQ in narcolepsy. *Immunogenetics* 1997; 46: 410-7.
- Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Quin X, Lin X, et al. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 686-99.
- Mignot E. History of narcolepsy at Stanford University. *Immunol Res* 2014; 58: 315-39.
- Kaparianos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *Neth J Med* 2006; 64: 280-9.
- Brunetti L, Francavilla R, Leonardo Miniello V, Leone M, Rana M, Colazzo D, et al. Influence of HLA antigens and OSAS in childhood: a preliminary report. *J Sleep Res* 2005; 14: 157-62.
- Lee SH. Analysis of HLA in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Tuberc Resp Dis* 2005; 59: 298-305.
- Mazotte T, Guidalini C, Mazzoti DR, Palombini L, Sousa AL, Tufik S, et al. The human leukocyte antigen DQB1*0602 allele is associated with electroencephalograph differences in individuals with obstructive sleep apnoea syndrome. *J Sleep Res* 2013; 22: 217-22.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 5: 225-35.
- Yoshizawa T, Akashiba T, Kurishina K, Otsuka K, Horie T. Genetics and obstructive sleep apnoea syndrome: a study of HLA typing. *Intern Med* 1993; 32: 94-7.
- Hedström A, Lima Bomfim I, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Alfreidsson L, et al. Interaction between adolescent

- obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 2014; 82: 865-72.
31. Procaccini C, Carbone F, Galgani M, La Rocca C, De Rosa V, Matarese G, et al. Obesity and susceptibility to autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 287-94.
32. Gami AS, Caples SM, Somers VK. Obesity and obstructive sleep apnea. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 2003; 32: 869-94.
33. Young T, Peppard P, Taheri S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1592-9.

Síndrome de apnea obstructiva del sueño y HLA en el norte de Portugal

Introducción. El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) es una enfermedad frecuente, compleja y poligénica, con diversas etiologías que interaccionan originando un fenotipo único. El SAOS puede ocurrir a cualquier edad del individuo y se presume la existencia de agregación familiar. Han sido descritos diversos factores de predisposición, como la edad, el sexo y la obesidad. La relación entre los polimorfismos del antígeno leucocitario humano (HLA) y trastornos del sueño está confirmada, tanto en poblaciones europeas como no europeas. No obstante, las relaciones descritas entre los alelos HLA y SAOS no han sido coherentes y carecen de valor informativo para la clasificación del trastorno del sueño.

Objetivo. Explorar la asociación genética del HLA con el SAOS en una población del norte de Portugal y evaluar el papel de la obesidad en el contexto del HLA en el SAOS.

Pacientes y métodos. Se estudió una cohorte de 131 pacientes con SAOS. Los pacientes fueron atendidos en una clínica del sueño ambulatoria donde se valoraron los antecedentes clínicos, se les practicó una polisomnografía nocturna, una prueba de latencia múltiple del sueño (si lo exigía el diagnóstico diferencial), analíticas y estudios demográficos. A efectos comparativos, se utilizó una población de control de 223 personas sanas. Se efectuó el genotipado del HLA-DRB1 con la reacción en cadena de la polimerasa mediante cebadores de secuencia específica.

Resultados. En esta cohorte, el alelo HLA-DRB1*03 fue identificado como un factor de predisposición para el SAOS (24% del SAOS frente a 15% de la población de control; $p = 0,025$; *odds ratio* = 1,861; intervalo de confianza al 95% = 1,081-3,205). No hubo diferencias significativas en lo referente a otros alelos HLA-DRB1*.

Conclusión. El HLA-DRB1*03 es un factor de predisposición para el SAOS en la población portuguesa.

Palabras clave. Factores de riesgo. HLA-DRB1*03. Obesidad. Sexo. Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS). Trastornos del sueño.

Síndrome de apnea obstructiva del sueño y HLA en el norte de Portugal

Luís Silva, João Lopes, João Ramalheira, Daniela Cunha, Cláudia Carvalho, Andreia Bettencourt, Sandra Brás, Paulo Costa, M. Berta Silva, António Martins-da-Silva

Introducción. El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) es una enfermedad frecuente, compleja y poligénica, con diversas etiologías que interaccionan originando un fenotipo único. El SAOS puede ocurrir a cualquier edad del individuo y se presume la existencia de agregación familiar. Han sido descritos diversos factores de predisposición, como la edad, el sexo y la obesidad. La relación entre los polimorfismos del antígeno leucocitario humano (HLA) y trastornos del sueño está confirmada, tanto en poblaciones europeas como no europeas. No obstante, las relaciones descritas entre los alelos HLA y SAOS no han sido coherentes y carecen de valor informativo para la clasificación del trastorno del sueño.

Objetivo. Explorar la asociación genética del HLA con el SAOS en una población del norte de Portugal y evaluar el papel de la obesidad en el contexto del HLA en el SAOS.

Pacientes y métodos. Se estudió una cohorte de 131 pacientes con SAOS. Los pacientes fueron atendidos en una clínica del sueño ambulatoria donde se valoraron los antecedentes clínicos, se les practicó una polisomnografía nocturna, una prueba de latencia múltiple del sueño (si lo exigió el diagnóstico diferencial), analíticas y estudios demográficos. A efectos comparativos, se utilizó una población de control de 223 personas sanas. Se efectuó el genotipado del HLA-DRB1 con la reacción en cadena de la polimerasa mediante cebadores de secuencia específica.

Resultados. En esta cohorte, el alelo HLA-DRB1*03 fue identificado como un factor de predisposición para el SAOS (24% del SAOS frente a 15% de la población de control; $p = 0,025$; *odds ratio* = 1,861; intervalo de confianza al 95% = 1,081-3,205). No hubo diferencias significativas en lo referente a otros alelos HLA-DRB1*.

Conclusión. El HLA-DRB1*03 es un factor de predisposición para el SAOS en la población portuguesa.

Palabras clave. Factores de riesgo. HLA-DRB1*03. Obesidad. Sexo. Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS). Trastornos del sueño.

Introducción

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) es una enfermedad frecuente, compleja y poligénica, con diversos factores de predisposición que interactúan para producir un fenotipo único [1-4]. El cuadro clínico consiste en episodios repetitivos de obstrucción total (apnea) o parcial (hipopnea) de las vías aéreas superiores que ocurren durante el sueño, aunque se mantenga el esfuerzo respiratorio [5,6]. La gravedad del SAOS se cuantifica con el índice de apnea-hipopnea (IAH), que registra el número de episodios de apnea o hipopnea por hora. Se considera relevante cuando el número de episodios es igual o superior a cinco. Los pacientes presentan ronquidos fuertes y frecuentes, apnea observada por segundas personas, sueño no reparador y somnolencia diurna excesiva [5].

El SAOS aparece a lo largo de toda la vida [1] y en los países occidentales afecta al 2-4% de los hombres y al 1-2% de las mujeres de mediana edad (40-

60 años) [2,5,7]. En las mujeres posmenopáusicas (sobre todo en las que no reciben hormonoterapia de reposición), la prevalencia aumenta, aunque sigue siendo inferior a la de los varones del mismo segmento de edad [2,8]. La American Academy of Sleep Medicine refiere valores de afectación por el SAOS del 3-7% en los varones adultos y del 2-5% en las mujeres [5]. El trastorno pasa con frecuencia desapercibido y permanece sin diagnosticar, porque los afectados interpretan los síntomas como una consecuencia normal de hábitos de vida poco saludables.

Varios factores de predisposición, la obesidad en especial, pero también la edad y el sexo, han sido implicados en el síndrome. Las alteraciones anatómicas del tejido óseo o de las partes blandas de las estructuras craneofaciales (nasales, bucales o bucofaringeas) y otros trastornos vinculados con la obstrucción nasal contribuyen a menudo al SAOS. La constricción de las vías aéreas altas es consecuencia de múltiples factores [5,6]. Esos diversos factores

CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (L. Silva). Serviço de Neurofisiologia; Departamento de Neurociências; Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto (J. Lopes, J. Ramalheira, D. Cunha, A. Martins-da-Silva). Laboratório de Imunogenética; Departamento de Patologia e Imunologia Molecular; Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto (D. Cunha, C. Carvalho, A. Bettencourt, S. Brás, M.B. Silva). Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica; Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto (C. Carvalho, A. Bettencourt, P. Costa, M.B. Silva, A. Martins-da-Silva). Departamento de Genética Humana; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (P. Costa). Porto, Portugal.

Correspondencia:

Prof. Dr. António Martins da Silva. Serviço de Neurofisiologia. Departamento de Neurociências. Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto. Largo Professor Abel Salazar. 4099-001 Porto, Portugal.

E-mail: ams@icbas.up.pt

Aceptado tras revisión externa: 18.06.15.

Cómo citar este artículo:

Silva L, Lopes J, Ramalheira J, Cunha D, Carvalho C, Bettencourt A, et al. Síndrome de apnea obstructiva del sueño y HLA en el norte de Portugal. Rev Neurol 2015; 61: 301-7.

English version available at www.neurologia.com

© 2015 Revista de Neurología

influyen en el IAH, la desaturación de la oxihemoglobina y la hipercapnia, consecuencias habituales de este trastorno complejo [1,5,7,9].

La obesidad y el sobrepeso influyen en el riesgo y en la gravedad del SAOS. Según la Organización Mundial de la Salud, la obesidad es una enfermedad corriente (endémica) en los países desarrollados [10] que entraña un riesgo para la salud a causa de la morbilidad y la mortalidad que lleva aparejadas [10, 11]. La obesidad y el sobrepeso se cuantifican con el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula con la fórmula = peso (kg) / estatura² (m). El valor límite para el sobrepeso es un IMC entre 25 y 29,9, y el de la obesidad, igual o mayor a 30 [10,11]. La obesidad aumenta el riesgo de SAOS [3]. En cambio, el adelgazamiento puede reducir su gravedad [3,12].

Con el fin de descubrir los genes causales del SAOS, se han llevado a cabo varios análisis de ligamiento del genoma completo y estudios de asociación de genes candidatos [13,14]. La heterogeneidad de los fenotipos clínicos del SAOS dificulta la identificación de los genes causales [4]. La agregación familiar [9] y los factores heredados contribuyen en torno al 40% del riesgo de SAOS [1,3], pero es improbable que exista un factor genético único. Puesto que la obesidad es un importante factor de predisposición para el SAOS, existe el riesgo de que el análisis de los marcadores genéticos pueda estar sesgado, por lo que los estudios genéticos de este síndrome deberían distinguir entre pacientes de peso normal y obesos.

Uno de los estudios de asociación genética más descritos en el ámbito de los trastornos del sueño es el de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). El HLA constituye un marcador genético que puede estar implicado en la patogenia de una enfermedad *per se* o por un gen localizado en la misma región (MHC), que puede predisponer o proteger de una enfermedad. La primera descripción de la relación entre los polimorfismos del HLA y los trastornos del sueño se describió en pacientes japoneses. La asociación entre la narcolepsia y el HLA-DR2 se dio a conocer en 1983 [15], y los resultados fueron publicados por el mismo grupo en 1984 [16]. Posteriormente, se descubrió que el alelo HLA-DQB1*06:02 era un marcador más adecuado para la narcolepsia en todos los grupos étnicos que el antígeno HLA-DR2 [17,18]. En algunas poblaciones, el 90-100% de los narcolépticos de tipo 1 son portadores de dicho alelo, a menudo acompañado por el HLA-DRB1*15:01 (HLA-DR2), que está en desequilibrio de ligamiento completo con HLA-DQB1*06:02 [19]. Los estudios de microsatélites en la región HLA-DQ indican que el factor de predisposición está lo-

calizado en esa región [20]. Los homocigotos para el alelo HLA-DQB1*06:02 presentan un riesgo dos o tres veces mayor de padecer narcolepsia. Los heterocigotos para el DQB1*06:02 que poseen otros alelos HLA de clase II (DQB1*03:01, DQA1*06, DRB1*04, DRB1*08, DRB1*11 y DRB1*12) también están en riesgo. Asimismo, se ha reconocido que varios alelos HLA-DQB1* (no HLA-DQB1*06:02) actúan como factores protectores [21,22].

Con todo, la relación de los alelos/antígenos HLA con el SAOS es mucho menos clara [23]. En 2005, Brunetti et al describieron en una población del sur de Italia [24] que los alelos HLA-A*33, DRB1*03 y DQB1*02 eran significativamente más frecuentes en los pacientes con SAOS que en los individuos sanos, pero esa significación se perdió tras aplicar las correcciones por comparaciones múltiples de Bonferroni [24]. Un estudio llevado a cabo con pacientes coreanos [25] reveló una asociación entre el SAOS y los genes *HLA-A*11* y *DRB1*09*. La frecuencia del alelo HLA-A*11 fue significativamente menor en los pacientes con SAOS (actuando como factor protector) y la del alelo HLA-DRB1*09 resultó superior que en los controles (actuando como factor de predisposición). Los autores también señalaron que el alelo HLA-DRB1*08 estaba asociado con la gravedad de la enfermedad [25]. Estudios más recientes han revelado cambios en el cociente de las frecuencias de las ondas electroencefalográficas durante el sueño en los pacientes con SAOS portadores del HLA-DQB1*06:02, un dato que ha abierto el debate sobre el papel de los alelos HLA en la estructura del sueño [26].

El presente estudio pretende contribuir al debate de las diferencias en las frecuencias de los HLA halladas en los pacientes con SAOS, analizando tales frecuencias en una población con SAOS bien caracterizada, no seleccionada y controlada del norte de Portugal. Se ha investigado si tales frecuencias son independientes de posibles factores de confusión, representados por los dos factores de riesgo más importantes del SAOS: la obesidad y el sexo.

Pacientes y métodos

Población del estudio

El estudio constó de una cohorte aleatoria de 371 pacientes (253 varones y 118 mujeres) con diversas alteraciones del sueño, que fueron evaluados consecutivamente en la clínica ambulatoria del sueño del Hospital Santo António/CHP, en Oporto (hospital terciario del norte de Portugal).

A los pacientes se les evaluó mediante anamnesis, exploración física y examen neurológico, polisomnografía nocturna con videograbación, que incluyó electroencefalograma, electrooculograma, electromiograma –mentón y extremidades inferiores–, ventilación nasal y bucal, y esfuerzo respiratorio torácico, saturación de O₂, electrocardiograma y ronquidos. Además, a los pacientes en que se sospechaba la presencia de narcolepsia de tipo 1 o 2 y de hipersomnia se les sometió a una prueba de latencia múltiple del sueño el día después del estudio nocturno. El mismo día de la polisomnografía nocturna se les extrajo una muestra de sangre venosa destinada a los análisis de laboratorio. El estudio contó con la aprobación del comité de ética del hospital.

Los médicos participantes repasaron las historias clínicas y el coordinador del estudio las confirmó como adecuadas. A continuación, los pacientes fueron clasificados según los criterios de la Clasificación Internacional de los Trastornos del Sueño, tercera edición [5]. De la cohorte inicial, 131 sujetos (35,3%; 114 hombres y 17 mujeres) presentaban SAOS (IAH > 5). El resto de la cohorte (*n* = 240; 139 varones y 101 mujeres) sufría otros trastornos del sueño y fueron considerados como pacientes sin SAOS, a saber: 58 pacientes (41 hombres y 17 mujeres) con ronquido primario o ronquido asociado con distrés respiratorio con un IAH < 5; y 182 pacientes con otros trastornos del sueño, principalmente insomnio, trastornos del movimiento periódico de las extremidades, narcolepsia, hipersomnia idiopática u otras hipersomnias. Todos los pacientes con SAOS, excepto cuatro, y 142 de los pacientes sin SAOS disponían del IMC calculado. El grupo de control estuvo constituido por 223 individuos con buen estado de salud comprobado por examen médico, del mismo origen étnico y reclutados entre donantes de sangre del norte de Portugal.

Extracción del ADN y genotipado

Se extrajeron muestras de sangre venosa periférica (10 mL) a los pacientes con trastornos del sueño y a los controles en tubos con ácido etilendiaminotetracético. Todos fueron informados sobre el estudio y otorgaron su consentimiento informado por escrito para el análisis genético.

El ADN genómico se extrajo de leucocitos de sangre periférica tratados con proteína K mediante un procedimiento de desalinización [27]. El ADN se amplificó con la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de secuencia específica para la identificación de los genes *HLA-DRB1*, con métodos y secuencias de cebadores antes descritos [28]. Los pro-

ductos de las reacciones en cadena de la polimerasa se visualizaron con luz ultravioleta tras la separación por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio. Los genotipos se dedujeron a partir de los patrones de amplificación.

Análisis estadístico

Las frecuencias fenotípicas de HLA-DRB1* se calcularon con cuenta directa. Las frecuencias de HLA de los pacientes con SAOS y sin SAOS y los controles se compararon con la prueba de la chi al cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher, según fuera apropiado. Se calcularon *odds ratios* (OR) y su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Los valores de *p* < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

A fin de identificar con más precisión los alelos específicos que contribuyen a la predisposición al SAOS, se aplicó una regresión logística escalonada, a nivel alélico con selección retrógrada. Comenzando por un modelo con todos los alelos HLA-DRB1, los alelos menos significativos se eliminaron sucesivamente de uno en uno hasta que todos los demás resultaron significativos, en función de una prueba de la razón de verosimilitud. Las OR obtenidas en el análisis de regresión logística multifactorial se ajustaron para los demás alelos incluidos en el modelo, y difieren de las obtenidas cuando un alelo dado se compara con todos los demás alelos. Los datos se analizaron con el programa SPSS v. 21.

Resultados

Las características demográficas de los 131 pacientes con SAOS aparecen resumidas en la tabla I.

La distribución por sexos muestra que la frecuencia de pacientes masculinos fue superior en la cohorte de SAOS (87% frente a 13% de mujeres). La media de edad de los pacientes era de 55,1 años, con valores similares en ambos sexos (55 años en varones y 55,5 en mujeres). Como la edad de incidencia máxima ronda los 50 años, se calculó la distribución de los pacientes con SAOS menores y mayores de 50 años, que resultó similar en ambos sexos (varones: 29,8% < 50 años, 70,2% ≥ 50 años; mujeres: 23,5% < 50 años, 76,5% ≥ 50 años) (Tabla I).

Para investigar el efecto de los determinantes genéticos de HLA sobre la predisposición al SAOS, se genotipó a los pacientes y los controles para determinar la frecuencia de los alelos HLA-DRB1* (Tabla II). La frecuencia del alelo HLA-DRB1*03 fue mayor en la población de SAOS que en la población

Tabla I. Características demográficas de los pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño.

	Todos los pacientes			Varones			Mujeres		
	<i>n</i>	%	Media	<i>n</i>	%	Media	<i>n</i>	%	Media
Número de pacientes	131	—	—	114	87	—	17	13	—
Edad (años)	—	—	55,1	—	—	55,0	—	—	55,5
Pacientes < 50 años	38	29,0	40,9	34	29,8	40,6	4	23,5	43,2
Pacientes ≥ 50 años	93	71,0	60,9	80	70,2	61,2	13	76,5	59,2
IMC (kg/m ²)	127 ^a	—	29,4	110	—	29,4	17	—	29,9
Pacientes con IMC < 30	77	60,6	26,4	68	61,8	26,6	9	52,9	24,7
Pacientes con IMC ≥ 30	50	39,4	34,2	42	38,2	33,9	8	47,1	35,7

IMC: índice de masa corporal. ^a Información no disponible en cuatro pacientes

de control (24% frente a 15%), una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,024$; OR = 1,86; IC 95% = 1,08-3,21). En el caso de los otros alelos HLA-DRB1 analizados, no se halló asociación alguna. A fin de verificar la independencia del alelo HLA-DRB1*03 respecto a la presencia de los otros alelos del HLA estudiados, se efectuó un análisis por regresión logística. El resultado confirma la asociación del alelo DRB1*03 con el SAOS ($p = 0,025$; OR = 1,861; IC 95% = 1,081-3,205). Cuando los pacientes con SAOS se dividieron en obesos y no obesos, no se hallaron diferencias en las frecuencias de los alelos del HLA entre los dos subgrupos (Tabla II).

Con el fin de averiguar si la obesidad incrementa el riesgo de SAOS [5,7,27], la cohorte de pacientes se dividió en dos subgrupos según el IMC (< 30 o ≥ 30), y la frecuencia de la obesidad se comparó con los datos publicados sobre la población portuguesa [11]. De los 127 pacientes con SAOS de los que se pudo calcular el IMC, el 39,4% eran obesos, y el 60,6% restante, no. El porcentaje de obesos fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con SAOS que el descrito en la población general de Portugal (39,4% frente a 14,2%; $p < 0,0001$; OR = 3,93; IC 95% = 2,74-5,63). Además, se evaluó la frecuencia de la obesidad en el subgrupo de 142 sujetos sin SAOS seleccionados al azar de la cohorte inicial de 371 pacientes cuyo IMC estaba disponible. En este grupo, 42 pacientes (29,6%) eran obesos (IMC > 30) y 100 no. Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (39,4% frente a 29,6%; $p = 0,096$). Cabe señalar que el porcentaje de individuos obesos en el subgrupo sin SAOS también re-

sultó significativamente mayor que el descrito en la población general portuguesa (29,6% frente a 14,2%; $p < 0,0001$; OR = 2,54; IC 95% = 1,76-3,66).

El valor medio del IMC era de 29,4 en los varones y 29,9 en las mujeres. Los pacientes con SAOS que no eran obesos presentaban un IMC de 26,6 en los varones y 24,7 en las mujeres, y los pacientes obesos con SAOS, un IMC de 33,9 en los varones y de 35,7 en las mujeres. Para comprobar si la presencia del alelo DRB1*03 influye en la obesidad, los pacientes con SAOS se dividieron en no obesos (IMC < 30) y obesos (IMC ≥ 30). La frecuencia del alelo fue inferior en los pacientes no obesos (20,8% frente a 30% en los obesos), pero la diferencia observada careció de significación estadística (Tabla III).

Además, planteamos la misma pregunta en el grupo sin SAOS, sin que tampoco se observaran diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes obesos y no obesos (9,5% frente a 16%).

Discusión

Como se ha dicho, el principal objetivo era investigar la relación entre el HLA y el SAOS en pacientes con trastornos del sueño del norte de Portugal.

Las características demográficas de los pacientes portugueses con SAOS son similares a las de otras poblaciones [5,8], con la frecuencia más alta en los hombres (87% frente a 13% en las mujeres; razón de sexos de 7:1), lo cual confirma que el sexo masculino es un factor de riesgo general para el SAOS (cociente masculino/femenino, 4:1 a 10:1) [8].

Tabla II. Frecuencias de los alelos HLA-DRB1* en pacientes portugueses con síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) y en la población de control.

	Controles (n = 223)	SAOS (n = 131) ^a	p	SAOS/obesos (n = 50)	SAOS/no obesos (n = 77)	p
DRB1*01	48 (22%)	28 (21%)	0,973	15 (30%)	12 (16%)	0,075
DRB1*03	33 (15%)	32 (24%)	0,024	15 (30%)	16 (21%)	0,292
DRB1*04	52 (23%)	28 (21%)	0,673	10 (20%)	18 (23%)	0,827
DRB1*07	58 (26%)	38 (29%)	0,54	13 (26%)	25 (33%)	0,552
DRB1*08	19 (9%)	16 (12%)	0,261	4 (8%)	12 (16%)	0,278
DRB1*09	13 (6%)	2 (2%)	0,052	0	2 (3%)	0,519
DRB1*10	7 (3%)	3 (2%)	0,642	0	3 (4%)	0,278
DRB1*11	44 (20%)	30 (23%)	0,479	10 (20%)	19 (25%)	0,666
DRB1*12	8 (4%)	4 (3%)	0,789	2 (4%)	2 (3%)	0,646
DRB1*13	68 (30%)	31 (24%)	0,167	14 (28%)	16 (21%)	0,396
DRB1*14	14 (6%)	8 (6%)	0,949	4 (8%)	3 (4%)	0,432
DRB1*15	47 (21%)	21 (16%)	0,245	7 (14%)	14 (18%)	0,629
DRB1*16	9 (4%)	8 (6%)	0,379	3 (6%)	5 (7%)	1,000

^a Información no disponible en cuatro pacientes.

También se ha constatado que el SAOS es más frecuente en los pacientes de mediana edad, con una media de 55,1 años (rango: 6-84 años). El SAOS aparece en una amplia franja de edades y su incidencia aumenta con la edad, con una meseta en la tercera edad [5].

En este estudio se halló una relación significativa entre el alelo HLA-DRB1*03 y el SAOS (el 24% en el SAOS frente al 15% en la población de control; $p = 0,025$). Esta relación es independiente del sexo. Tales resultados concuerdan con los observados por Brunetti et al, en los que el alelo HLA-DRB1*03 aparece sobrerrepresentado en niños italianos con SAOS (24,4% frente a 12,8%; $p = 0,03$) [24]. En estos momentos no existe una respuesta para la pregunta sobre cómo influye el HLA en el SAOS. Ambos resultados, los del presente estudio en adultos y los de los niños [24], abordan esa pregunta y promueven el debate. Como apunte para el debate destacamos que el SAOS en los niños y en los adultos puede tener una base fisiopatológica distinta, aunque esto no sea cierto para todos los pacientes con SAOS. La relación entre el HLA y el SAOS hallada en estas

Tabla III. Prevalencia del HLA-DRB1*03 en pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño (obesos/no obesos) (n = 127) ^a.

		HLA-DRB1*03
IMC < 30	Total (n = 77)	16 (20,8%)
	Varones (n = 68)	13 (19,1%)
	Mujeres (n = 9)	3 (33,3%)
IMC ≥ 30	Total (n = 50)	15 (30,0%)
	Varones (n = 42)	13 (30,9%)
	Mujeres (n = 8)	2 (25,0%)

IMC: índice de masa corporal. ^a Información no disponible en cuatro pacientes.

poblaciones podría indicar que ciertos individuos con tales características genéticas son más predispuestos a padecer distrés respiratorio durante el sueño (SAOS). Otra vía que hay que comentar arran-

ca de la hipótesis planteada por Riha, quien considera que 'el genotipo del síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño se ve afectado por la carencia de una definición coherente del fenotipo [...] en un momento puntual concreto' [1]. El concepto de individualización de un resultado significativo en un 'momento puntual concreto' en los pacientes con SAOS también podría ayudar a entender los resultados obtenidos en poblaciones distintas por razones de etnia o de características demográficas.

De hecho, estudios llevados a cabo en poblaciones asiáticas y en otras poblaciones europeas con SAOS han demostrado otras asociaciones distintas con el HLA. Un estudio nipón [29] con una cohorte de 32 varones con SAOS no logró demostrar relación alguna entre los alelos HLA-DR y los pacientes con SAOS. Otro estudio coreano [25] con 25 pacientes con SAOS (24 hombres y una mujer) describió que la frecuencia del alelo HLA-DRB1*09 era mayor (23% en el SAOS frente a 16% en la población de control). En el mismo estudio, los autores limitaron el análisis a los casos más graves de apnea y entonces constataron un aumento de la frecuencia del alelo HLA-DRB1*08 (36% en el SAOS frente a 20% en la población de control). Nuestro estudio no corrobora esos resultados. Ambos estudios son relevantes, pero no consiguieron analizar cohortes representativas. Cabe observar que podrían estar implicados otros factores, como el origen étnico o las características demográficas inherentes, la más destacada de las cuales es la razón entre sexos.

El citado estudio japonés [29] expone que los 'pacientes portadores del HLA-A2 eran más obesos que los no portadores' y 'que la incidencia superior de SAOS en los pacientes se debió a la influencia de este marcador genético sobre la obesidad' [29]. Los resultados del estudio posteriormente se consideraron sesgados por la presencia de un número sustancialmente mayor de obesos entre los pacientes con SAOS que en la población de control [24]. Como en otras enfermedades, las interacciones entre el genotipo HLA y el IMC aún son objeto de debate sobre si sustentan el papel del HLA en la obesidad [30].

La prevalencia de la obesidad (39,4%) en la cohorte del presente estudio prácticamente triplica la descrita en la población portuguesa (14,2%) [11]. Los resultados obtenidos revelan que la obesidad multiplica por tres o cuatro el riesgo de contraer el síndrome (OR = 3,93), en concordancia con otros estudios que califican la obesidad como un factor patogénico habitual del SAOS en la población adulta [3,5,12,31-33].

En el presente estudio hallamos que el SAOS está asociado con el alelo HLA-DRB1*03 y también

con la obesidad. A fin de estudiar el posible efecto de confusión de la obesidad sobre las frecuencias de los alelos HLA en el SAOS, se realizó un análisis de regresión ajustado para la edad, el sexo y el IMC para dilucidar y evitar el posible sesgo de la influencia de este alelo en la obesidad. Los resultados de este análisis refuerzan la conclusión de que el HLA-DRB1*03 está asociado con el SAOS y que esa relación es independiente de la obesidad en este grupo de pacientes.

En definitiva, la relación entre el SAOS, los alelos del HLA y los factores de riesgo (obesidad y sexo) ha sido estudiada por primera vez en una población portuguesa y, por lo que sabemos, es la mayor cohorte estudiada hasta la fecha. Las conclusiones son que el alelo HLA-DRB1*03 constituye un factor de predisposición para el SAOS, y que ser varón y obeso aumenta el riesgo de padecerlo. Será preciso confirmar estos resultados en otras poblaciones y en cohortes más grandes.

Bibliografía

1. Riha RL. Genetics aspects of the obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome –is there a common link with obesity? *Respiration* 2009; 78: 5-17.
2. Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. *Curr Genom* 2009; 10: 119-26.
3. Redline S, Tishler P. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev* 2000; 4: 583-602.
4. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. The genetics of obstructive sleep apnoea. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 536-42.
5. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders, third edition. Darien, IL: AASM; 2014.
6. Ho M, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011; 3: e15.
7. De Sousa AG, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obes Rev* 2008; 9: 340-54.
8. Jordan AS, McEvoy RD. Gender differences in sleep apnea: epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 377-89.
9. Parish J. Genetic and immunologic aspects of sleep and sleep disorders. *Chest* 2013; 143: 1489-99.
10. World Health Organization. Obesity and overweight. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>. [11.12.2014].
11. Carmo I, Santos O, Camotas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2007; 9: 11-9.
12. Smith P, Gold A, Meyers D, Haponik E, Bleecker E. Weight loss in mild to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 1985; 103: 850-5.
13. Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 136: 187-205.
14. Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet* 2007; 8 (Suppl 1): S9.
15. Honda Y, Asaka A, Tanaka Y, Juji T. Discrimination of narcoleptic patients by using genetic markers and HLA. Book of abstracts of the 4th International APSS Congress of Sleep Research; 1983. p. 316.

16. Juji T, Satake M, Honda Y, Doi Y. HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. All patients were DR2 positive. *Tissue Antigens* 1984; 24: 316-9.
17. Mignot E, Lin X, Arrigoni J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J, et al. DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep* 1994; 17 (Suppl 8): S60-7.
18. Martins-da-Silva A, Lopes J, Ramalheira J, Carvalho C, Cunha D, Costa P, et al. Utilidad de la caracterización genética de la narcolepsia y la hipersomnia en la definición del fenotipo: estudio en pacientes portugueses. *Rev Neurol* 2014; 58: 49-54.
19. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998; 50 (Suppl 1): S16-22.
20. Ellis M, Hettsimer A, Ruddy D, Hansen S, Kronmal G, McClelland E. HLA class II haplotypes and sequence analysis support a role for DQ in narcolepsy. *Immunogenetics* 1997; 46: 410-7.
21. Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Quin X, Lin X, et al. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 686-99.
22. Mignot E. History of narcolepsy at Stanford University. *Immunol Res* 2014; 58: 315-39.
23. Kapariianos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *Neth J Med* 2006; 64: 280-9.
24. Brunetti L, Francavilla R, Leonardo Miniello V, Leone M, Rana M, Colazzo D, et al. Influence of HLA antigens and OSAS in childhood: a preliminary report. *J Sleep Res* 2005; 14: 157-62.
25. Lee SH. Analysis of HLA in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Tuberc Res Dis* 2005; 59: 298-305.
26. Mazotte T, Guidalini C, Mazzoti DR, Palombini L, Sousa AL, Tufik S, et al. The human leukocyte antigen DQB1*0602 allele is associated with electroencephalograph differences in individuals with obstructive sleep apnoea syndrome. *J Sleep Res* 2013; 22: 217-22.
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
28. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 5: 225-35.
29. Yoshizawa T, Akashiba T, Kurishina K, Otsuka K, Horie T. Genetics and obstructive sleep apnoea syndrome: a study of HLA typing. *Intern Med* 1993; 32: 94-7.
30. Hedström A, Lima Bomfim I, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Alfredsson L, et al. Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 2014; 82: 865-72.
31. Procaccini C, Carbone F, Galgani M, La Rocca C, De Rosa V, Matarese G, et al. Obesity and susceptibility to autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 287-94.
32. Gami AS, Caples SM, Somers VK. Obesity and obstructive sleep apnea. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 2003; 32: 869-94.
33. Young T, Peppard P, Taheri S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1592-9.

Obstructive sleep apnoea syndrome and HLA in the North of Portugal

Introduction. The obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is a common, complex and polygenic disease with diverse aetiologies interacting to produce a single phenotype. OSAS occurs throughout the entire lifespan and familial aggregation has been suggested. Several predisposing factors, as age, gender and obesity have been described. Associations between HLA polymorphisms and sleep disorders are confirmed, in European and Non-European descendent populations. However the associations found between HLA alleles and OSAS have not been consistent and have no informative value for sleep disorder classification.

Aims. To explore the genetic association of HLA with OSAS in a northern Portuguese population and to evaluate the role of obesity in the context of HLA in OSAS.

Patients and methods. A cohort of 131 patients with OSAS was studied. Patients followed up in an Outpatient Sleep Clinic were assessed by clinical history, night sleep polygraphic recording, multiple sleep latency test (when necessary for differential diagnosis), laboratorial and demographic studies. A control population (CP) of 223 healthy individuals was used for comparison. HLA-DRB1 genotyping was performed using a polymerase chain reaction with sequence specific primers methodology.

Results. In this cohort, the HLA-DRB1*03 allele was identified as a susceptibility factor for OSAS (24% OSAS vs. 15% CP; $p = 0.025$; odds ratio = 1.861; 95% CI = 1.081-3.205). No significant differences were found for other HLA-DRB1* alleles.

Conclusion. HLA-DRB1*03 is a susceptibility factor for OSAS in Portuguese population.

Key words. Gender. HLA-DRB1*03. Obesity. Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS). Risk factors. Sleep disorders.

8.3.2. Publicações científicas enviadas para publicação em revistas peer reviewed

Elsevier Editorial System(tm) for Revista
Portuguesa de Pneumologia, Portuguese Journal of Pulmonology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Co-Morbidities and Obstructive Sleep Apnoea Severity in a cohort
of Portuguese Patients

Article Type: Original Article

Keywords: Co-morbidity; Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; Sleep
Disorders; Metabolic Disorders; Obesity

Corresponding Author: Prof. António Martins-da-Silva, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Hospital Santo António - Centro
Hospitalar do Porto

First Author: Luís Silva, DMD

Order of Authors: Luís Silva, DMD; Daniela Cunha, MSc; João Lopes, MD;
João Ramalheira, MD; Manuel Freire-Garabal, MD, PhD; Silvia Novio, PhD;
María Jesús Núñez Iglesias, PhD; Denisa Mendonça, PhD; António Martins-
da-Silva, MD, PhD

Abstract: INTRODUCTION: Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS) is a
common and chronic disorder frequently associated to other morbid
conditions. Such conditions may act as risk factors and influence the
morbidity and mortality of OSAS.

OBJECTIVES: To analyse the presence of co-morbidities (CoM) in a cohort
of OSAS patients, recruited in a sleep outpatient clinic from Northern
Portugal, stratified as a function of OSAS severity.

RESULTS: A cohort of 319 sleep disordered patients was clinical and sleep
EEG recording evaluated. Patients (n=209) with Sleep Respiratory Distress
(SRD) had OSAS (n=145) with severity according to Apnoea/Hypopnea Index
(AHI); 64 had Primary Snoring or Snoring and Respiratory Distress with
AHI<5; and 110 other sleep disorders. A full study of individual
background was possible in 128 OSAS patients. The prevalence of unique or
multiple CoM were assessed by clinical and analytical studies grouped as
a function of OSAS severity.

DISCUSSION: The presence of CoM was of 57% on the total of OSAS patients
and with 79.5% in the severe group of OSAS. Forty seven of patients had
only one CoM. The most common was obesity (56.3%), followed by high blood
pressure, diabetes and other cardiovascular disorders. In patients with
multiple CoM, obesity was always present in the most severe cases. When
compared with the group of patients without SRD the CoM condition was
more frequently related to OSAS (p=0.0196).

CONCLUSION: Comorbidities are commonly associated to OSAS independently
of disease severity. Among the comorbidities present obesity was the most
common in the most severe OSAS cases.

TITLE: Co-Morbidities and Obstructive Sleep Apnoea Severity in a cohort of Portuguese Patients

Authors: Luís Silva¹, Daniela Cunha², João Lopes², João Ramalheira², Manuel Freire-Garabal³, Silvia Novio³, María Jesús Núñez Iglesias³, Denisa Mendonça^{4,5}, António Martins-da-Silva^{2,4}

Affiliations:

¹ CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Portugal.

² Serviço de Neurofisiologia – Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal.

³Departamento de Farmacologia, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

⁴UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal.

⁵Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar and Instituto de Saúde Pública – Universidade do Porto, Porto, Portugal

Corresponding Author:

Prof. Doutor A Martins da Silva
Serviço Neurofisiologia/Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto
4099-001 Porto (Portugal)
E-mail: ams@icbas.up.pt

*Manuscrito/Manuscript

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is a common and chronic disorder resulting from diverse aetiologies [1-2] frequently associated to other morbid conditions [3-6]. OSAS could occur in infancy, because Ear, Nose and Throat (ENT) dysfunction or lesions or abnormal development, but is more prevalent in adults, namely in men [1, 8-13] or in women after menopause [1]. OSAS is characterized by repetitive episodes of pharyngeal collapse leading to apnoea (if collapse is total) and hypopnoea (if partial) during sleep, although the respiratory effort is still present [2, 7-8]. A decrease in amplitude of air flow higher than 50% is characteristic of apnoea and if it is between 25-50% is characteristic of hypopnoea [8]. Apnoea severity is defined according to an Apnoea/Hypopnoea Index (AHI) [8]: the number of apnoea or hypopnoea *per hour*.

The episodes of apnoea/hypopnoea are frequently associated clinical symptoms such as arousals, sleep fragmentation, among others [10, 14-16] that could influence the existence of a rather general morbid condition [17-18]. Likewise, the degree of environmental influences on the development of OSA is unknown, but is undoubtedly considerable [1].

Besides these common varieties of symptoms that flourishes to clinical OSAS picture it is also frequent the association between OSAS and other clinical entities, that not being part of the clinical OSAS picture they are commonly associated as Co-morbidities (CoM). In this respect, we can highlight the metabolic syndrome (obesity, impaired glucose metabolism/insulin resistance, hypertension, hyper-triglyceridemia and lower high-density lipoprotein cholesterol, impotence and pro-inflammatory state) [10, 19-20], cardiovascular disease [14] and cancer [21-23]. These components may act as risk factors and influence the morbidity and mortality of individuals affected by OSAS [16, 19].

Taking all these information into account, it is clear that the identification of Co-Morbidities (CoM) in OSAS patients is necessary to improve OSAS clinical picture (OSAS+CoM) treatment. However as the severity of the clinical condition (OSAS +CoM) is influenced by the level of OSAS severity this relationship needs to be determined. This is why the present study address to the association between OSAS and CoM as a function of OSAS severity qualification/quantification, considering such severity as a factor that could influence the morbid condition. With better identification of factors that aggravate the clinical condition the treatment could be better addressed and more complete.

OBJECTIVES

The purpose of this study is to analyse the presence of co-morbidities in a cohort of OSAS patients, recruited in a sleep outpatient clinic from Northern Portugal, stratified as a function of OSAS severity and analyse the possible influence of such severity on the clinical condition OSAS-CoM.

PATIENTS AND METHODS

Patients:

The study group consisted on the analysis of a cohort of 319 Sleep Disordered patients consecutively and prospectively assessed within a period of 10 months, for the first time occurring to the Sleep Outpatient Clinic of the Hospital Santo António, Porto, Northern of Portugal. The research was conducted in accordance with Helsinki Declaration and approved by the Hospital Ethics Committee.

Evaluation:

Each patient underwent a Standard Overnight Sleep Laboratory Polysomnography (PSG) study with video-polygraphic recording including EEG (electroencephalogram) / EOG

(electro-oculography) / EMG (electromyography) / ECG (electrocardiogram) / Nasal and Thoracic Respiration / O₂ Saturation / Movement / and Behaviour to document sleep parameters and sleep architecture. PSG variables and AHI severity (mild AHI 5-15; moderate 15-30; severe > 30) were defined accordingly to standards [8, 24].

The prevalence of CoM was assessed by clinical and analytical studies and grouped on the following entities: Obesity (as a function of Body Mass Index (BMI) >30, according to WHO [25]), Diabetes, High Blood Pressure (HBP), Cardiovascular/Vascular, Neurological, Muscle-skeletal disorders, Cancer, ENT disorders and Upper Airway Respiratory Disorders, Psychiatric disorders. All these co-morbidities were also analysed as a function of OSAS severity sub groups.

Differences in the proportions/percentages between groups were assessed using chi-square test and values of $p < 0.05$ to indicate statistically significant differences.

RESULTS

Studied Population:

From the initial cohort of 319 Sleep Disordered patients (226M/93F) consecutively evaluated by clinically and sleep EEG recording, 209 had Sleep Respiratory Distress (OSAS or other) and 110 (56M/59F) had, according to ICSD3 [8], Sleep Disorders without respiratory distress. From this last group 46 patients (22 M, 24 F) had Periodic Limb Movement, 18 (8M/10F) Insomnia, 9 (3M, 6F) Narcolepsy or other Hypersomnia, 6 (1M, 5F) Parasomnia, 6 (4M, 2F) other sleep disorders, and 25 had no specific sleep alteration.

Of the group of Sleep Respiratory Distressed patients ($n=209$:173 M, 36 F), 64 (45M, 19F) had Primary Snoring or Snoring and Respiratory Distress with an AHI <5, and 145 (128 M, 17 F) fulfil the sleep polygraphic criteria for Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS). A full study of individual background was only possible in 128 patients.

The group of 128 patients with OSAS was fully assessed for the presence/absence of co-morbidities. For purposes of results comparison the group of 110 Non-Respiratory Distressed patients underwent the same assessment.

Co-morbidities:

Table 1 provides a description of the sample according to the gender, age and severity of OSAS. The majority of patients were male, with mild or moderate apnoea. The cohort of 128 OSAS patients (111M, 17F) has a mean age of 54.6 years (Table 1 – upper part). The distribution by gender of the 96 OSAS patients with co-morbidities follows the same proportion as the general OSAS populations, in which the majority of patients were males (Table 1 – lower part). Considering the severity subgroups the distribution was also similar to the general group. The majority of patients belong to mild or moderate severity (Table 1 – lower part).

For the purpose of the analysis of the CoM distribution by OSAS severity, the presence of CoM was 75% on the total and highest in the group with severe apnoea (Table 2). However no significant difference between the OSAS severity subgroups was found ($p=0.739$). In the non-respiratory distressed patients the presence of CoM was of 61%.

Analysing the most common individual co-morbidities found in OSAS patients, obesity was the most frequent one followed by HBP, diabetes, cardiovascular diseases and psychiatric disorders (Table 3). If we consider the subgroups of OSAS severity and compare distribution of the co-morbidities between them, it is possible to check that obesity is present in 84% (26/31) of the patients with severe apnoea. When the distribution of HBP is searched is found on all subgroups and both with other cardiovascular/vascular disorders are the most common co-morbidities in non-respiratory distressed patients. Cancer is a co-morbid condition only present in mild or moderate AHI subgroups in our population (Table 3).

The presence of co-morbidities in non-respiratory distressed patients was significantly lower than in OSAS patients and had different etiological distribution, being cardiovascular and high blood pressure the most frequent (Table 3).

The association between the number of CoM and OSAS severity was assessed by comparing the number of CoM to apnoea severity (Table 4). Approximately half (47%) of all OSAS patients with CoM, presented only one CoM. Obesity was the most common. The remaining 53% showed multiple co-morbidities. Again, obesity was one of the two main CoM. The other one was HBP. Both (Obesity + HBP) were associated to other CoM in all groups but more frequent (as also if both alone – Obesity and HBP) in more severe apnoea (Table 4). Although the occurrence of multiple CoM was higher in the mild and moderate AHI subgroups than in the severe subgroup, the differences were not significant ($p=0.405$).

The relationship between co-morbidities and sleep disorder in the groups of patients studied was assessed by comparing the presence/absence of co-morbidities in the group of OSAS patients vs. the patients on the group of Non- Respiratory Distressed. Differences in frequencies between groups were assessed using chi-square test and values of $p=0.0196$ indicate that the co-morbid condition was more frequently related to OSAS.

DISCUSSION

Morbid conditions associated to sleep pathologies are rather common and can be the reason why diverse sleep disorders have flourished semiology. OSAS is an example of common sleep pathology that is frequently associated to other morbid conditions and, among these, those included as co-morbid metabolic entities. These entities, namely obesity, cardiovascular disturbances or diabetes are part of the ‘metabolic burdens’ which may be largely influenced by genes that have an effect on insulin resistance and body fat distribution, aggravating OSAS picture and currently interfering on sleep structure, as described by

Schimnd et al. 2015 [26] suggesting that OSAS may be part of a ‘metabolic’ syndrome [10].

Obesity is the most documented co-morbidity and major risk factor for OSAS [10] in adults [20] or in children [1, 20]. The mechanism suggested appears to be the reduction of nasopharyngeal calibre secondary to fat deposition in upper airway tissues and/or as a result of hypoventilation due to a decrease in chest wall compliance [1, 10]. It is also known that weight loss may reduce the severity of the condition [10]. In the present study we analysed the association and the influence of comorbidities on the aggravation of the OSAS.

In order to contribute to the study of the role of comorbidities in OSAS we studied a population of sleep disordered patients (with or without respiratory distress) consecutively and prospectively assessed. We analysed the distribution of comorbidities by OSAS overall group and within OSAS severity subgroups and we tested the influence of such comorbidities by comparing the findings on OSAS patients to non-respiratory distressed patients.

In our study the rate of association of co-morbidities (mainly included on the “metabolic burden”) and sleep disturbances is significantly higher in OSAS patients when compared to non-sleep respiratory distressed patients. This result documents that the association between comorbidities and OSAS is common.

In this study we also tested if the OSAS severity (determined by the AHI) was influenced by or associated to the Co-morbid condition. The finding that co-morbidities are more frequent in more severe apnoea patients does support such hypothesis.

When co-morbidities were ranked by frequency, obesity is the most common and more frequently associated to OSAS. When we analyse the distribution of CoM between groups obesity is always present within the group of multiple co-morbidities in the most severe OSAS cases. When obesity is taken apart no patients with severe OSAS were found. And when multiple co-morbidities are present the influence of obesity is less impressive. These

results support other studies stating that obesity is the most common comorbidity in OSAS having a role on improving the severity of this condition.

In non-respiratory distressed patients the type of co-morbidities shows differences with obesity losing relevance. The same finding was present on the less severe OSAS cases (AHI < 30) that are more associated to other comorbidities than obesity.

Taking altogether these findings improved the understanding of the relationship between comorbidities and OSAS and vice versa. In one way, because CoM are common already in less severe apnoea cases it can be expected that OSAS can negatively influence the course of the co-morbid clinical entities. In the other way, because obesity is the common factor for OSAS severity aggravation and consequent sleep disturbance, it is expected that such aggravation also deteriorate the “metabolic burden” of patient condition.

CONCLUSION

The present work confirms that at the time of sleep disorder diagnosis co-morbidities of the “metabolic burden” are commonly associated to OSAS, independently of disease severity.

The findings of this common association in non-severe cases of OSAS has strong implications on definition of the best strategy of treatment in order to avoid patient health deterioration, and increased risk for disease (with apnoea severity increased and failure of the metabolic condition).

REFERENCES

1. Riha R. Genetic Aspects of the Obstructive Sleep Apnea/Hypopnea Syndrome-Is There a Common Link with Obesity? *Respiration* 2009;78(1):5–17
2. Varvarigou V, Dahabreh IJ, Malhotra A, Kales SN. A review of genetic association studies of obstructive sleep apnea: field synopsis and meta-analysis. *Sleep* 2011; 34(11):1461-1468.
3. Fusetti M, Fioretti A, Valenti M, Masedu F, Lauriello M, Pagliarella M. Cardiovascular and metabolic comorbidities in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2012; 32(5):320-325
4. Thomas J, Ren J. Obstructive sleep apnea and cardiovascular complications: perception versus knowledge. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(12): 995-1003.
5. Hızlı Ö, Özcan M, Ünal A. Evaluation of Comorbidities in Patients with OSAS and Simple Snoring. *The Scientific World Journal* 2013; 2013:709292. doi:10.1155/2013/709292.
6. Huang YC, Chun-Yao L, Wu YK, Lim CS, Huang CY, Huang HL, Yeh KH, Liu YC, Yang MC. Comparison of cardiovascular co-morbidities and CPAP use in patients with positional and non-positional mild obstructive sleep apnea. *BCM Pulmonary Medicine* 2014; 14(153):1-11.
7. Ho M, Brass S. Obstructive Sleep Apnea. *Neurol Int.* 2011 November 29; 3(3): e15. Published online 2011 December 2. doi: 10.4081/ni.2011.e15
8. ICSD 3. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and coding manual, 3rd Ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
9. Gabbay I, Lavie P. Age- and Gender-related characteristics of obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2012; 16(2):453-460.

10. Kaparianos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *The Netherlands Journal of Medicine* 2006; 64 (8): 280-289.
11. Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive Sleep Apnea Syndrome: From Phenotype to Genetic Basis. *Current Genomics* 2009; 10(2):119-126.
12. Jordan A, McEvoy R. Gender differences in sleep apnea: epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. *Sleep Med Rev* 2003; 7(5):377-389.
13. De Sousa A, Cercata C, Mancini M, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Obesity Reviews* 2008; 9(4):340-354.
14. Netze N, Stoohs R, Netzer C, Clark K, Strohl K. Using the Berlin Questionnaire to Identify Patients at Risk for the Sleep Apnea Syndrome. *Annals of Internal Medicine* 1999; 131(7):485-491.
15. Yoshizawa T, Akashiba T, Kurishina K, Otsuka K, Horie T. Genetics and Obstructive Sleep Apnoea Syndrome: a study of HLA typing. *Internal Medicine* 1993; 32(2):94-97.
16. Hiestand D, Britz P, Goldman M, Phillips B. Prevalence of Symptoms and Risk of Sleep Apnea in the US Population: Results from the National Sleep Foundation Sleep in America 2005 Poll. *Chest* 2006; 130(3):780-786.
17. Angelico F, Ben M, Augelletti T, Vita R, Roma R, Violi F, Fabiani M. Obstructive sleep apnoea syndrome and the metabolic syndrome in an internal medical setting. *Eur J Intern Med* 2010; 21(3): 191-195.
18. Khan F, Walsh C, Lane SJ, Moloney E. Sleep Apnoea and its Relationship with Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic and other Morbidities. *The Irish Medical Journal* 2014; 107(1): 6-8.

19. Gasa M, Salord N, Fortuna A, Mayos M, Vilarrasae N, Dorca J, Montserrat JM, Bonsignore MR, Monasterio C. Obstructive sleep apnoea and metabolic impairment in severe obesity. *Eur Respir J* 2011; 38(5):1089-1097.
20. Bonsignore M, McNicholas W, Montserrat J, Eckel J. Adipose tissue in obesity and obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012; 39(3):746-767.
21. Javier-Nieto F, Peppard P, Young T, Finn L, Mae HK, Farre R. Sleep-disordered Breathing and Cancer Mortality. Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Resp Crit Care Med* 2012; 182(2):190-194.
22. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia M, Martinez M, Duran-Cantolla J, de la Peña M, Masdeu M, Gonzalez M, Campo Fd, Gallego I, Marin JM, Barbe F, Montserrat JM, Farre R; Spanish Sleep Network. Association between Obstructive Sleep Apnea and Cancer Incidence in a Large Multicenter Spanish Cohort. *Am J Respir Crit Care* 2013; 187(1): 99-105.
23. Christensen A, Clark A, Salo P, Nymann P, Lange P, Prescott E, Rod NH. Symptoms of Sleep disordered breathing and risk of cancer: a prospective cohort study. *Sleep* 2013; 36(10): 1429-1435.
24. Flemons WW, Buysse AD, Redline S, Pack A, Strohl K, Wheatley J, Young T, Douglas N, Levy P, McNicholas W, Fleetham J, White D, Schmidt-Nowarra W, Carley D, Romaniuk J. Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep*. 1999; 22(5):667-689.
25. WHO - World Health Organization. View in December 11, 2014; de Fact Sheet N°311 - Obesity and Overweight: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.

26. Schmid S, Hallschmid M, Schultes B. The metabolic burden of sleep loss. Lancet Diabetes Endocrinol 2015; 3(1):52-62.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Quadros/Tables

TABLES

Table 1 - Distribution of patients with OSAS (AHI >5) and with CoM as a function of OSAS severity

	Mild (AHI 5-15)	Moderate (AHI 15-30)	Severe (AHI >30)	OSAS (Total)
OSAS patients [n (%)]				
Total	59 (46%)	30 (23%)	39 (31%)	128
Males	47 (42%)	29 (26%)	35 (32%)	111 (87%)
Females	12 (71%)	1 (5%)	4 (24%)	17 (13%)
Mean Age(years) of OSAS patients [\bar{x}]				
Total	54.1	53.8	56.1	54.6
Males	53.1	53.9	56.8	54.5
Females	57.8	51	49.5	55.5
OSAS patients with CoM [n (%)]				
Total	43 (45%)	22 (23%)	31 (32%)	96
Males	31 (39%)	21 (26%)	28 (35%)	80 (83%)
Females	12 (75%)	1 (6%)	3 (19%)	16 (17%)
Mean Age (years) of OSAS patients with CoM [\bar{x}]				
Total	55.8	54.3	57.1	55.9
Males	55	54.4	58.3	56
Females	57.8	51	46	55.2

OSAS – Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; AHI – Apnoea/Hypopnea Index per hour of sleep;
CoM – Comorbidities; n – number of patients; % - percentage; \bar{x} – mean age.

Table 2 - Presence/Absence of CoM in OSAS and Non-Respiratory Distressed Patients

Co-Morbidities	OSAS Patients				Non-Respiratory Distressed
	ML	MO	S	Total OSAS	
Presence [n (%)]	43 (72.8%)	22 (73.3%)	31(79.5%)	96 (75%)	67 (61%)
Absence [n (%)]	16 (27.2%)	8 (26.7%)	8 (20.5%)	32 (25%)	43 (39%)
Total (n)	59	30	39	128	110

OSAS – Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; ML – Mild Apnoea/Hypopnoea Index; MO – Moderate Apnoea/Hypopnea Index; S – Severe Apnoea/Hypopnoea Index; n – number of patients; % - percentage.

Table 3 - Number of patients with specific co-morbidity in OSAS and in Non-Respiratory Distressed Sleep patients (in this table the total number of CoM is higher than the number of patients because various patients have more than one CoM).

Co-Morbidities	OSAS				Non-Respiratory Distressed (n=67)
	Mild (n=43)	Moderate (n=22)	Severe (n=31)	Total (n=96)	
Obesity (BMI>30)	19 (44%)	9 (45%)	26 (84%)	54 (56%)	12 (18%)
HBP	17 (39%)	7 (32%)	10 (32%)	34 (35%)	15 (22%)
Diabetes	8 (18%)	4 (18%)	5 (16%)	17 (18%)	7 (10%)
Cardiovascular and Vascular Disorders	9 (21%)	1 (5%)	5 (16%)	15 (16%)	16 (24%)
Psychiatric disorders	6	2	1	9	8
Muscle-skeletal disorders	4	3	2	9	10
Neurological disorders	4	2	2	8	5
Cancer	3	5	-	8	7
ENT disorders and upper airway respiratory disorders	4	2	2	8	6
Blood Pathology	3	3	-	6	4
Miscellaneous	4	2	2	8	11

OSAS – Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; Mild - Mild Apnoea/Hypopnoea Index; Moderate - Moderate Apnoea/Hypopnoea Index; Severe - Severe Apnoea/Hypopnoea Index; BMI – Body Mass Index; HBP – High Blood Pressure; ENT – Ear Nose and Throat; n – number of patients; % - percentage.

Table 4 - Presence of one or multiple co-morbidities and most common ones in OSAS patients

Co- morbidities	Mild (n=43)	Moderate (n=22)	Severe (n=31)	OSAS (n=96)
Only 1 co-morbidity [n (%)]	17/45 (38%)	11/45 (24%)	17/45 (38%)	45/96 (47%)
Obesity	5/17 (29%)	3/11 (27%)	12/17 (71%)	20/45 (44%)
Multiple co-morbidities [n (%)]	26/51 (51%)	11/51 (22%)	14/51 (27%)	51/96 (53%)
Obesity + HBP + other	5/26 (19%)	5/11 (46%)	8/14 (57%)	18/51 (35%)
(Obesity + HBP)	-	-	4/8 (50%)	4/18 (22%)
Obesity + other (not-HBP)	9/26 (35%)	1/11 (9%)	6/14 (43%)	16/51 (31%)
HBP + other (not-obesity)	11/26 (42%)	2/11 (18%)	-	13/51 (26%)
Others (not HBP neither Obesity)	1/26 (4%)	3/11 (27%)	-	4/51 (8%)

OSAS – Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; Mild - Mild Apnoea/Hypopnoea Index; Moderate - Moderate Apnoea/Hypopnea Index; Severe - Severe Apnoea/Hypopnoea Index; HBP –High Blood Pressure; n – number of patients; % - percentage.

**GENETIC CHARACTERIZATION OF APOE IN OBSTRUCTIVE SLEEP
APNOEA SYNDROME PATIENTS FROM THE NORTH OF PORTUGAL AND
A META-ANALYSIS OF THE PUBLISHED DATA**

Running Title: ApoE in Portuguese OSAS patients

Luís Silva¹, Andreia Bettencourt^{2,3}, Cláudia Carvalho^{2,3}, Bárbara Leal^{2,3}, Daniela Cunha^{2,4}, João Lopes⁴, João Ramalheira⁴, Carolina Lemos⁵, Manuel Freire-Garabal⁵, Sílvia Novio⁵, María Jesús Núñez Iglesias⁵, António Martins da Silva^{3,4}, Berta Martins da Silva^{2,3}

1. CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Gandra, Portugal
2. Laboratório Imunogenética - Departamento de Patologia e Imunologia Molecular- Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.
3. Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (UMIB/ICBAS-UP), Porto, Portugal.
4. Serviço de Neurofisiologia – Departamento Neurociências - Hospital Santo António/Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal
5. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela, España.
6. Departamento Estudo de Populações, ICBAS/Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Corresponding author:
Prof. Dr. A Martins da Silva
Serviço Neurofisiologia
Hospital Santo António-Centro Hospitalar do Porto
Largo Prof Abel Salazar
4099-001 Porto (Portugal)
E-mail: ams@icbas.up.pt

Keywords: Obstrutive Sleep Apnoea (OSA); Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS); Apolipoprotein E (APOE); Sleep Apnoea Genetics

Abstract

Background: Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) has a strong heritable component, although its genetic basis remains largely unknown. Several genetic studies have been performed for identification of possible candidate genes that could be associated with OSAS. One of the most studied associations has been between OSAS and the Apolipoprotein E (APOE) gene.

Objective: The objective of this study was to investigate the association between APOE alleles and OSAS in a well characterized Portuguese population.

Methods: Two hundred and four patients with sleep disorders from the north of Portugal, and 285 healthy individuals ethnically matched, voluntarily recruited from the same geographical area, were genotyped for APOE alleles. The severity of OSAS was defined as an apnoea-hypopnoea index (AHI) > 5. We also performed a systematic review of the literature and our results were included into a meta-analysis along with data from 11 published studies for a total of 2995 OSAS patients and 6036 controls.

Results: No association was found between APOE alleles and patients. The overall analysis revealed no association between APOE ϵ 2 allele (OR [95%CI] = 0.962 [0.750 – 1.28]) or APOE ϵ 4 allele (OR [95%CI] = 1.10 [0.88 – 1.37]) and OSAS development.

Conclusions: The results of this study points towards an overall lack of association between APOE and the risk of OSA in the Portuguese population.

Introduction

Among sleep disorders Obstructive Sleep Apnoea (OSA) or Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS) is one of the most prevalent clinical entities, affecting 3-7% of adult men and 2-5% of adult women [1]. The causes for complete (apnoea) or partial (hypoapnoea) cessation of airflow are diverse involving complex and multiple factors (anatomic or other individual dysfunctions) reflecting a complex and multifactorial pathology. OSAS severity is classified by the Apnoea-Hypopnoea Index (AHI) as mild, moderate or severe [1].

Factors such as age, sex, obesity, anatomical skeletal facial changes, menopause, tobacco and alcohol use, increase the risk of OSAS [1, 2]. Obesity and overweight have a strong genetic basis supported by substantial heritability factors, and are major contributing factors to OSAS since they are present in approximately 70% of patients with this disorder [3, 4].

Since the pioneer work of Strohl et al. [5], in 1978, a number of studies have shown a familiar predisposition for OSAS, demonstrating that individuals who have a family member with OSAS have increased risk for apnoea. A percentage of 35 to 40% of disease variance can be attributed to genetic factors [6].

Several genetic studies have been performed in the last decades for the identification of possible candidate genes that could be associated with OSAS [7]. One of the most studied associations has been between OSAS and the Apolipoprotein E (APOE) gene region. In humans, this gene is located in chromosome 19. Three APOE alleles have been described $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$. Several authors support an association of the APOE $\epsilon 4$ allele with increased risk of OSAS, but others reject this idea [8].

APOE is a plasma protein that influences lipoprotein receptor binding affinity and serum lipid levels. The APOE $\epsilon 4$ allele is strongly associated with cerebrovascular and Alzheimer's disease. This allele is also associated with elevations in total cholesterol and with the risk of atherosclerotic disease. The APOE $\epsilon 2$ allele has the opposite effect. APOE alleles could influence OSAS pathogenesis through their effect on neural input to upper airway musculature and ventilator control [9]. Interestingly it appears that APOE gene expression can be involved in maintaining pharyngeal muscle tone and in this way influence the OSAS susceptibility [10].

Published studies investigating the potential association of APOE, specifically APOE $\epsilon 4$ and OSAS are not consistent as already stressed. Recently a meta-analysis[11]fail to corroborate an association between APOE $\epsilon 4$ allele and OSA noting that available studies are not sufficiently robust to identify weak associations.

The aim of the present study was to investigate, in a well characterized and homogenous population of patients with Obstructive Sleep Apnoea, whether APOE polymorphisms are genetic risk factors for OSAS.

Subjects and Methods

Association study

Patients and Controls

The study included 204 patients with sleep disorders from north of Portugal (145 men and 59 women; mean age at record of 54.2 ± 12 years) consecutively assessed at the Outpatient Sleep Clinic of Hospital de Santo Antonio - Centro Hospitalar do Porto. From these, 113 patients had OSAS and 91 had Other Sleep Disorders (OSD) (primary snoring, narcolepsy, insomnias, periodic limb movement parasomnias and others). Each patient underwent a clinical evaluation and a night sleep video-polygraphic recording of multiple variables: Electroencephalography (EEG), Electro-oculography (EOG), Electrocardiograph (ECG), Electromyography (EMG) chin and lower limbs, Nasal and Thoracic Respiration and O_2 Saturation, to characterize sleep structure. Multiple Sleep Latency Test (MSLT) was performed on the following day, when necessary for hypersomnia/narcolepsy diagnosis.

Apnoea was defined as complete cessation of airflow lasting 10 seconds or more; hypopnoea was defined as either a $>50\%$ reduction in airflow for 10 s or more or less than 50% but discernible reduction in airflow accompanied either by a decrease in oxyhemo-globin saturation or an arousal [1]. Apnoea severity was classified using the Apnoea-Hypopnoea Index (AHI). This index was obtained by dividing the total number of apnoea and hypopnoea episodes observed per hour of sleep. According to ISCD 2014 [1] OSAS was excluded if $AHI < 5$, and considered mild if AHI 5-14, moderate if AHI 15-30 and severe if $AHI > 30$ [12].

The control population (CP) comprised 285 healthy individuals voluntarily recruited among blood donors, ethnically matched, with similar gender predominance and from the same geographical area. This study was approved by the Institutional Review Board of the Centro Hospitalar do Porto. Written informed consent was obtained from all participants, in accordance to the Helsinki Convention.

DNA analysis

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leucocytes collected in 5% EDTA tubes by a salting-out procedure. Blood collection was performed on the morning after the night sleep video-polygraphic recording. APOE genotyping was performed using a Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment–Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay with the restriction enzyme *Hin6I*, as described previously [13].

Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium in the genotypic distributions was assessed for each group. Allelic and genotypic frequencies in patients and controls were compared using the Pearson chi-square test or Fisher's exact test, as appropriated. Continuous data was presented as mean (standard deviation). Student's t-test was used when comparing these variables. Data were analysed with SPSS v.21 statistical software (SPSS, Inc. Chicago, USA). Significance levels were set at $\alpha < 0.05$.

Systematic review and meta-analysis

Search strategy and inclusion criteria

A MEDLINE and EMBASE database search was performed to retrieve papers linking APOE and OSA development available online by September 2015. The query used for search was the following: sleep disordered breathing or SBD [MeSH Terms] or Obstructive Sleep Apnoea or OSA [MeSH Terms] or Obstructive Sleep Apnoea Syndrome or OSAS [MeSH Terms] and Apolipoprotein E or Apolipoprotein E4 [MeSH Terms] or APOE. All references in these results were explored to identify additional studies not indexed in MEDLINE and EMBASE databases. Included studies had to meet all the criteria: 1) original data from independent studies; 2) enough data to calculate odds ratios (OD's) and 95% confident intervals (CIs) or directly reported these

values; 3) publication in a peer-reviewed journal; 4) investigation of all APOE isoforms; 5) case-control, cohort, or family-based design with case and control populations; 6) if multiple publications from the same group were found, the one with the most complete and recent results was selected.

Data extraction

From each of the included studies relevant data was extracted independently by two authors (B.L. and A.B.): first author, year of publication, and number of patients and controls by genotype, OR and 95%CI. Disagreements were settled by consensus.

Statistical analysis and publication bias

Odds Ratio (OR) and the corresponding 95% Confidence Interval (CI) were estimated by a random-effect model with Comprehensive Meta-analysis statistical program (Biostat, USA). The heterogeneity statistics was based on the Q-test. If P value was under 0.1 statistically significant heterogeneity was assumed among studies and I^2 value indicated the degree of heterogeneity (<25% = no, 25-50% = moderate, 50-75% = high and >75% = extreme heterogeneity). Forrest plots were generated. Publication bias was evaluated with the Begg and Egger's test and respective funnel plots were generated.

Results

Association study

The cohort of 113 OSAS patients included 99 males and 14 females, with a mean age of 54.2 years (54.0 years in males and 55.2 years in females; Table 1). The group of 91 OSD patients included 46 males and 45 females, with a mean age of 51.9 years (52.8 years in males and 51.0 years in females; Table 1).

The APOE allelic and genotypic frequencies obtained for CP, for OSA patients and for patients with OSD are described in Table 2. No statistically significant differences were observed (Table 2). The E3/E3 genotype was the most represented genotype in all groups and the E2/E4 and E4/E4 genotypes were absent in OSAS as well as in OSD patients. The frequency of APOE alleles were similar in all groups studied. Considering OSAS severity 3 subgroups of patients (mild, moderate and severe OSAS) were

analysed. The E3/E4 genotype was more frequent in the severe group although the difference did not reach statistical significance (14.0% mild vs. 13.8% moderate vs. 20.6% severe, $p=0.674$).

Meta-analysis

In total 11 published studies met our inclusion criteria (Table 3). Data from included studies, along with the results obtained in our population, totalled a sample of 2995 OSAS patients and 6036 controls (Table 3).

Eight of the included studies focused on the association between $\epsilon 2$ and OSAS development [10, 14-19]. Two of these studies [10, 19] reported that APOE $\epsilon 2$ allele confers a higher risk for OSAS development. The remaining six studies, including ours, found no association between this APOE allele and the risk for OSAS [14-18]. The overall analysis revealed no association between APOE $\epsilon 2$ allele and OSAS development (OR [95%] = 0.962 [0.750 – 1.28]). A moderate heterogeneity between studies was found ($I^2=44.0\%$, $P=0.065$) (Figure 1) but no publication bias was observed (funnel plot not shown).

Eleven studies focus on the association between APOE $\epsilon 4$ and OSAS development. Two studies have reported that APOE $\epsilon 4$ allele may be a susceptibility factor for OSAS [20, 21] whilst one described that this isoform may be a protective factor for sleep apnoea [10]. The remaining studies, including the present one, found no association between this APOE isoform and OSAS development [14-16, 18, 19, 22, 23]. The overall analysis does not support an association between APOE $\epsilon 4$ allele presence and OSAS development (OR [95%CI] = 1.10 [0.88 – 1.37]). There is a high heterogeneity ($I^2=64.3\%$, $P=0.002$) (Figure 2) between studies but without evidence of publication bias (funnel plot not shown).

Discussion

The present study addresses the question if the APOE polymorphisms are genetic risk factors for OSAS. The results obtained did not show statistically significant differences in the frequency of APOE alleles and genotypes between OSAS patients and CP.

Nevertheless the E3/E4 genotype was more frequent in the severe group although the difference was not statistically significant.

Clinical observation confirms that a variety of sleep disorders occurs commonly in the same family. Several lines of evidence suggest that OSAS have a substantial hereditary component [24] and others that a family “clustering” of OSAS do exist [1]. A genome-wide scan of OSAS families reported a linkage peak on chromosome 19 that includes the APOE gene [25]. However, the results obtained with this cohort of Portuguese patients, indicate that it is unlikely that APOE isoforms contribute significantly to OSAS susceptibility. This observation is in agreement with several recent studies [7, 8, 11, 16, 18, 23] and also with Saarelainen *et al.* [14] that first suggested this lack of association over a decade ago. Posterior replication studies show contradictory results with the APOEε4 allele being described as either a susceptibility [20, 21] or a protective factor for OSAS [10]. The APOE ε2 allele has also been described as associated with OSAS development [10, 19]. Due to these inconsistent results, Kalra *et al.* [9] studied Tag SNP covering the entire APOE gene. They found that Single Nucleotide Polymorphism upstream of the promoter region of the APOE gene are associated with development of OSAS in children [9].

In 2015 Uyum *et al.* [19] reported that APOE ε2 allele could be a susceptibility factor for OSA. However, a recent meta-analysis does not support these findings [11]. The meta-analysis conducted in the present study pooled data from more patients and controls (data from Uyum *et al.* [19] and from our cohort) to improve statistical power. The results are in accordance with the previous ones. It is worthy of note that a moderate to high heterogeneity between studies has been found. This heterogeneity cannot be explained by differences in demographic characteristics or ethnicity [11]. It may be a reflex of gene-gene or gene-environment interactions not addressed in this type of studies.

Another explanation for linkage peak on chromosome 19 is the existence of another gene, in this region, responsible for that association. A number of other candidate genes in the APOE region should be considered [10]. For example, the gene CLPTM1 influences muscle function, craniofacial form and hypoxic responses, variables frequently involved in OSAS, and is thus a potential player in OSAS

pathophysiology. The same happens with the cleft lip and palate membrane-associated membrane gene, DMPK, a gene for myotonic dystrophy protein kinase, and with HIF3A, a gene for hypoxia inducible factor 3[10]. Further fine mapping of the region will be necessary to better refine the genetics of OSAS.

Despite the apparent lack of association between APOE and OSAS susceptibility, it is possible that this molecule could have a biological role in OSAS by some other mechanism. Pellegrino et al., [26] proposed that APOE polymorphisms, instead of conferring risk, could be involved in the modulation of the adverse consequences of sleep-disordered breathing. It is well documented that APOE has an important role in neurocognitive function, brain injury recovery and oxidative stress and inflammatory responses [9, 27, 28]. This means that the presence of particular APO E alleles could promote the development of symptoms as a consequence of intermittent hypoxia, as observed in OSAS.

Genetic association studies may be hampered by genetic differences among ethnic groups. The APOE ϵ 4 allele frequencies in different populations range from about 10 to 23% being higher in northern regions of Europe and in the European descendant populations of North America and Canada than in southern Europe [29]. Consequently, genetic epidemiologic studies of APOE should be carried out at different latitudes, as the contribution of the ϵ 4 polymorphism to OSAS may not be the same for all populations.

In conclusion, the available evidence does not support a significant association between APOE and the risk of OSAS. Nevertheless, it should be acknowledged that the reported studies are underpowered for identifying small genetic effects.

References

1. Medicine AAsS. *International Classification of Sleep Disorders*. 3rd ed; Darien IL; 2014.
2. Ho ML, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011;**3**:e15.
3. Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2002;**360**:237-245.
4. de Sousa AG, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obes Rev* 2008;**9**:340-354.
5. Strohl KP, Saunders NA, Feldman NT, Hallett M. Obstructive sleep apnea in family members. *N Engl J Med* 1978;**299**:969-973.
6. Kaparinos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *Neth J Med* 2006;**64**:280-289.
7. Varvarigou V, Dahabreh IJ, Malhotra A, Kales SN. A review of genetic association studies of obstructive sleep apnea: field synopsis and meta-analysis. *Sleep* 2011;**34**:1461-1468.
8. Thakre TP, Mamtani MR, Kulkarni H. Lack of association of the APOE epsilon 4 allele with the risk of obstructive sleep apnea: meta-analysis and meta-regression. *Sleep* 2009;**32**:1507-1511.
9. Kalra M, Pal P, Kaushal R, Amin RS, Dolan LM, Fitz K, *et al*. Association of APOE genetic variants with obstructive sleep apnea in children. *Sleep Med* 2008;**9**:260-265.
10. Larkin EK, Patel SR, Redline S, Mignot E, Elston RC, Hallmayer J. Apolipoprotein E and obstructive sleep apnea: evaluating whether a candidate gene explains a linkage peak. *Genet Epidemiol* 2006;**30**:101-110.
11. Xu H, Qian Y, Guan J, Yi H, Yin S. No association between the APOE epsilon2 and epsilon4 alleles and the risk of obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep* 2015;**3**:313-318.
12. Force: AAsMT. Sleep-Related Breathing Disorders In Adults: Recommendations For Syndrome Definition And Measurement Techniques In Clinical Research. *Sleep* 1999;**22**:667-689.
13. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;**31**:545-548.
14. Saarelainen S, Lehtimäki T, Kallonen E, Laasonen K, Poussa T, Nieminen MM. No relation between apolipoprotein E alleles and obstructive sleep apnea. *Clin Genet* 1998;**53**:147-148.
15. Cosentino FI, Bosco P, Drago V, Prestianni G, Lanuzza B, Iero I, *et al*. The APOE epsilon4 allele increases the risk of impaired spatial working memory in obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2008;**9**:831-839.
16. Nikodemova M, Finn L, Mignot E, Salzieder N, Peppard PE. Association of sleep disordered breathing and cognitive deficit in APOE epsilon4 carriers. *Sleep* 2013;**36**:873-880.
17. Tisko R, Sopkova Z, Habalova V, Dorkova Z, Slaba E, Javorsky M, *et al*. Effects of apolipoprotein E genotype on serum lipids in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2014;**43**:1097-1105.
18. Osorio RS, Ayappa I, Mantua J, Gumb T, Varga A, Mooney AM, *et al*. Interaction between sleep-disordered breathing and apolipoprotein E genotype on cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in cognitively normal elderly individuals. *Neurobiol Aging* 2014;**35**:1318-1324.
19. Uyum E, Balbay O, Annakkaya AN, Gulec Balbay E, Silan F, Arbak P. The Relationship between Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Apolipoprotein E Genetic Variants. *Respiration* 2015.

20. Gozal D, Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Crabtree VM. APOE epsilon 4 allele, cognitive dysfunction, and obstructive sleep apnea in children. *Neurology* 2007;**69**:243-249.
21. Kadotani H, Kadotani T, Young T, Peppard PE, Finn L, Colrain IM, *et al.* Association between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA* 2001;**285**:2888-2890.
22. Foley DJ, Masaki K, White L, Redline S. Relationship between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing at different ages. *JAMA* 2001;**286**:1447-1448.
23. Gottlieb DJ, DeStefano AL, Foley DJ, Mignot E, Redline S, Givelber RJ, *et al.* APOE epsilon4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: the Sleep Heart Health Study. *Neurology* 2004;**63**:664-668.
24. Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;**135**:187-205.
25. Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin E, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, *et al.* A whole-genome scan for obstructive sleep apnea and obesity. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:340-350.
26. Pellegrino R, Mazzotti DR, Guindalini C, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S. Apolipoprotein E polymorphisms and sleep quality in obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Chim Acta* 2011;**412**:2223-2227.
27. Kheirandish L, Row BW, Li RC, Brittian KR, Gozal D. Apolipoprotein E-deficient mice exhibit increased vulnerability to intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits. *Sleep* 2005;**28**:1412-1417.
28. O'Hara R, Luzon A, Hubbard J, Zeitzer JM. Sleep apnea, apolipoprotein epsilon 4 allele, and TBI: mechanism for cognitive dysfunction and development of dementia. *J Rehabil Res Dev* 2009;**46**:837-850.
29. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol* 1992;**9**:155-167.

Table 1: Demographic data of the studied population (by AHI value and diagnostic)

	OSAS				OSD	P OSAS vs. OSD
	Total	mild	moderate	severe		
Total	113	50	29	34	91	
Males, n (%)	99 (87.6)	41 (82.0)	28 (96.6)	30 (88.2)	46 (50.5)	<0.0001
Females, n (%)	14 (12.4)	9 (18.0)	1 (3.4)	4 (11.8)	45 (45.5)	
Age, mean (SD)						
Total	54.2 (11.6)	53.6 (10.9)	53.1(12.1)	56.2 (12.4)	51.9 (13.3)	0.188
Males	54.1 (12.1)	52.5 (11.5)	53.1 (12.3)	57.1 (12.5)	52.8 (14.7)	0.215
Females	55.3 (7.8)	58.3 (4.9)	51.0 (0.0)	49.5 (11.1)	51.1 (11.8)	0.570

OSAS - Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; OSD- Other Sleep Disorders

Table 2 – APOE genotype and allelic frequencies in OSA, OSD and CP.

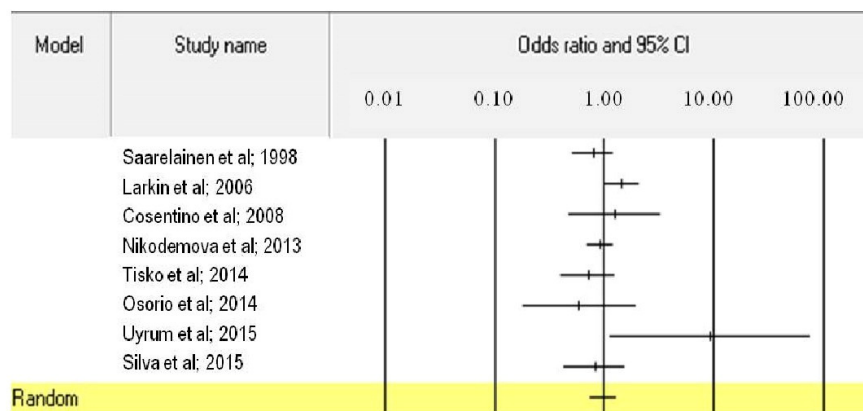
Genotypes	CP (n=285) % (n)	OSAS (n=113) % (n)	OSD (n=91) % (n)	p OSAS vs. CP	p OSD vs. CP	p OSAS vs. OSD
E2/E3	12.6 (36)	11.5 (13)	14.3 (13)	0.758	0.683	0.554
E2/E4	1.1 (3)	0 (0)	0 (0)	0.274	0.326	-
E3/E3	72.6 (207)	72.6 (82)	71.4 (65)	0.990	0.823	0.857
E3/E4	13.3 (38)	15.9 (18)	14.3 (13)	0.502	0.817	0.745
E4/E4	0.4 (1)	0 (0)	0 (0)	0.528	0.572	-
Alleles						
E2	6.8 (39)	5.8 (13)	7.1 (13)	0.575	0.889	0.568
E3	85.6 (488)	86.3 (195)	85.7 (156)	0.807	0.973	0.869
E4	7.5 (43)	8 (18)	7.1 (13)	0.841	0.858	0.755

CP- Control Population; OSA - Obstructive Sleep Apnoea; OSD- Other Sleep Disorders

Table 3 – Studies included in the meta-analysis.

Study	CP	OSAS	£4		£2	
			OR	95% CI	OR	95% CI
Saarelainen et al; 1998[14]	728	291	1	0.75 - 1.33	0.8	0.52 - 1.25
Foley et al; 2001[22]	416	302	0.78	0.53 - 1.16	NR	NR
Kadotani et al; 2001[21]	724	67	1.83	1.09 - 3.06	NR	NR
Gottlieb et al; 2004[23]	1437	338	1.25	0.96 - 1.63	NR	NR
Larkin et al; 2006[10]	796	415	0.75	0.58 - 0.97	1.46	1.02 - 2.08
Gozal et al; 2007[20]	199	146	8.04	2.3 - 28.15	NR	NR
Cosentino et al; 2008[15]	121	123	1.21	0.64 - 2.31	1.25	0.48 - 3.28
Nikodemova et al; 2013[16]	1146	697	0.9	0.73 - 1.11	0.93	0.7 - 1.22
Tisko et al; 2014[17]	128	391	CNC	CNC	0.71	0.4 - 1.27
Osorio et al; 2014[18]	25	70	1.18	0.43 - 3.23	0.59	0.18 - 1.97
Uyrum et al; 2015[19]	31	42	2.9	0.559 - 15.01	9.37	1.13 - 77.72
Silva et al; 2015	285	113	1.061	0.598 - 1.88	$\frac{0.83}{1}$	0.435 - 1.588

CP- Control Population; OSAS - Obstructive Sleep Apnoea Syndrome; OSD- Other Sleep Disorders; NR = not reported; CNC = cannot be calculated



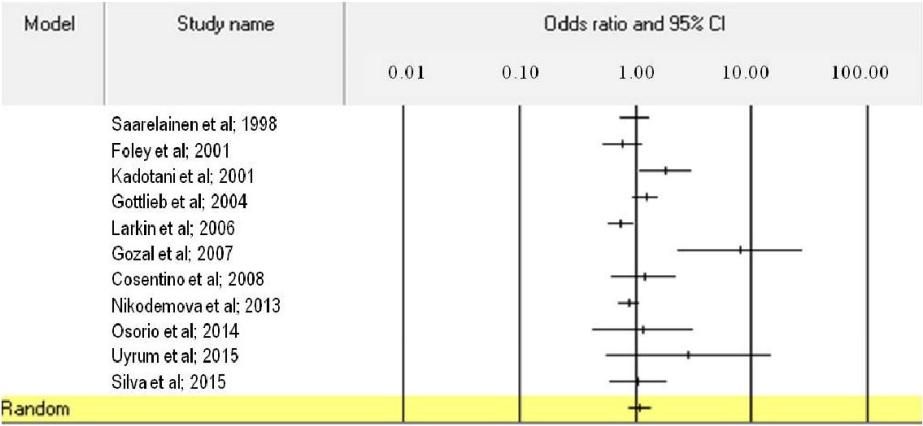


Figure 2 – Forest plot of the association between APOEε4 and OSAS

8.3.3. Trabalhos apresentados no 22nd Congress of the European Sleep Research Society (ESRS) em Tallinn 2014.

ESRS 2014 - Abstract P884

Is HLA-DRB1*03 a risk factor for obstructive sleep apnoea syndrome?

L. Silva¹, C. Carvalho², D. Cunha^{2,3}, J. Lopes³, J. Ramalheira³, B. M Silva², P. Costa^{2,4}, A. Martins da Silva^{2,3}

ICESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Gandra, 2UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto (ICBAS-UP), 3Serviço Neurofisiologia, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto, 4Dpt. Genética - Instituto Nacional Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal

Objective: In spite of progress made for sleep disorders such as Restless Leg Syndrome and Narcolepsy, the genetic basis of Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS) remains largely unidentified. HLA class II genotyping is widely used to support Narcolepsy diagnosis. No such robust association exists between HLA and OSAS. The objective of this study was to explore the genetic association of HLA with OSAS in a northern Portuguese population.

Methods: A cohort of 127 patients with OSAS (110 males and 17 females, mean ages 52/42) were studied. HLA-DRB1 genotyping was performed using sequence-specific primer PCR. A control population of 223 healthy individuals was used. Statistical evaluation relied on Chi-Square and Fisher's exact tests, and an allelic level stepwise logistic regression using forward selection.

Results: HLA DRB1*03 allele frequency was significantly overrepresented in patients (25% vs. 15%, $p=0.016$). No significant differences were found for other HLA-DRB1 alleles.

Conclusions: Our results shows a positive association of HLA-DRB1*03 with OSAS in Portuguese patients. HLA studies in sleep disorders are useful not only to confirm the diagnosis but also to identify individuals at risk. Although preliminary, these results fit with the findings of Brunetti (2005) that reported, for an Italian population of children with OSAS, that this allele was significantly overrepresented (24.4% vs. 12.8%, $p=0.03$). Together, these results suggest that HLA genotype may be a useful tool in the evaluation of sleep disorders beyond Narcolepsy.

Assigned speakers:

Luis Silva , CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde , Gandra , PT

Assigned in sessions:

19.09.2014, 17:15-18:45, Poster, P28, Sleep disorders - Breathing 3, Poster Exhibition

Is HLA-DRB1*03 a risk factor for Obstructive Sleep Apnoea Syndrome?

L. Silva¹, C. Carvalho², D. Cunha^{2,3}, J. Lopes³, J. Ramalheira³, B. M Silva², P. Costa^{2,4}, A. Martins da Silva^{2,3}

¹CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Portugal, ²UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal. ³Serviço Neurofisiologia – Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal, ⁴Dpt. Genética - Instituto Nacional Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal



BACKGROUND

The Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS) is a common but complex and polygenic disease with a number of etiologies interacting to produce a single phenotype. This syndrome is characterized by cessation or significant decrease in airflow (commonly as a result of upper airway collapse during sleep) leading to hypoxaemia and hypercapnia, in which the arousal from sleep is a result of strong respiratory effort. Familial aggregation has been suggested by several reports of families with multiple affected members. The differential diagnosis of Sleep Disorders (SD) is often a difficult task, due to the fact that SD may have common symptoms in their initial stages.

Associations between HLA polymorphisms and sleep disorders are well documented, in several studies, in European and Non-European descendent populations. Narcolepsy, for instance, is strongly associated with the HLA-DQR1*0602 allele in different populations. These genetic associations are taken into account by the physician for differential diagnosis and to confirm Narcolepsy. In spite of the progress made, the genetic basis for OSAS remains largely unidentified. The associations found between HLA alleles and OSAS have not been consistent and have no informative value for SD classification. .

AIM: To explore the genetic association of HLA with OSAS in a northern Portuguese population.

METHODS

• Patients

A cohort of 128 patients with Obstructive Sleep Apnoea Syndrome was studied, in which 111 were males (87%) and 17 were females (13%), with a mean age of 52 and 42 years, respectively. The patients belonged to a consecutive study of 324 patients followed up in the Outpatient Sleep Clinic of Hospital Santo António/C.H.Porto and were assessed by Clinical Night Sleep Polygraphic Recording, and a Multiple Sleep Latency Test on the following day if necessary (Narcolepsy or other Hypersomnia suspicion). Blood venous samples were collected after informed consent and Ethical approval was obtained. The Control Population (CP) comprised of 223 reportedly healthy individuals from the same geographic origin.

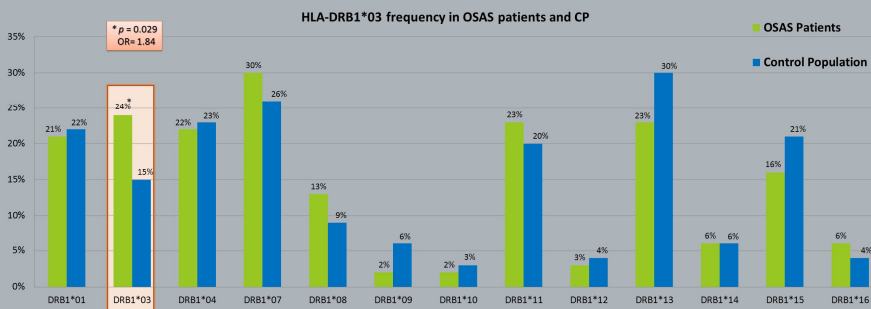
• Genotyping

HLA-DRB1 genotyping was performed using a **Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR–SSP)** methodology.

• Statistical Analysis

HLA-DRB1 frequencies were determined by direct counting. Statistical evaluation was performed with Chi-Square and Fisher’s exact tests, and an allelic level stepwise logistic regression using forward selection. All analyses were done with SPSS v.21 software (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS



- ✓ HLA-DRB1*03 frequency was significantly higher in patients (24% vs. 15%, $p=0.029$; OR (95% IC) = 1.84 (1.06-3.18)).
- ✓ No significant differences were found for other HLA-DRB1* alleles.

COMMENTS

Presently, there is no consensus regarding the association between OSAS and HLA class II alleles. Our results show a positive association of HLA-DRB1*03 with OSAS in Portuguese patients. This result is in line with the findings of Brunetti (2005) that have reported that the HLA-DRB1*03 allele was significantly more frequent in patients with OSAS (24.4% OSAS vs. 12.8% CP, $p=0.03$) in a Southern Italy population [1]. On the other hand, a Korean study reported that the HLA-DRB1*09 allele frequency was increased when compared with controls [2]. In our cohort we didn't confirm this finding (2% in OSAS vs. 6% in the CP), probably due to the different genetic background of European and Non-European Populations. Nonetheless, these results suggest that HLA genotype may be a useful tool, conditional on population origin, in the evaluation of sleep disorders other than Narcolepsy.

References: [1] Brunetti et al. J. Sleep Res. 14, 157-162 (2005); [2] Sang Haek Lee et al. Tuberc Respir Dis 59: 298-305 (2005)

ESRS 2014 - Abstract P513

Co-Morbidities in a Portuguese sample of obstructive sleep apnoea patients

A. Martins da Silva^{1,2}, *L. Silva*³, *D. Cunha*^{1,2}, *J. Lopes*¹, *J. Ramalheira*¹

¹Serviço Neurofisiologia, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto, ²UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, ³CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Gandra, Portugal

Objective: Co-morbidities are frequent in Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS). Characterization of co-morbid condition in OSAS patients is necessary for adequate treatment. Our objective was to analyse the association of co-morbidities in a specific sample of OSAS patients from Northern of Portugal.

Methods: A cohort of 324 Sleep Disordered patients was consecutively evaluated. OSAS was confirmed after night sleep video-polygraphic recording (EEG/EOG/EMG/ECG/Nasal and Thoracic Respiration/ O₂Saturation/ Movement/ Behaviour) in 141 patients (124 Males/17 Females) Aged (mean): 54.6 (54.4/55.7) years. Co-morbidities: obesity and dyslipidaemia, hypertension (HTA), cardiovascular (CV) disorders, diabetes, psychiatric, neurological/neuromuscular, ENT disorders, were also analysed as a function of OSAS severity (AHI).

Results: From 141 OSAS patients, 96 (68%) (80-M/16-F) have co-morbidities. OSAS was Severe (S:AHI>30) in 31 patients, Moderate (M:AHI-16-30) in 24, Mild (ML: AHI>5-15) in 41. Most common co-morbidities were: obesity in 45 patients (21 S; 6 M; 18 ML) and dyslipidaemia in 10 (1S; 4M; 5ML), HTA in 33 (11S; 6M; 16 ML), diabetes in 20 (6S; 3 M; 11ML), cardiovascular diseases in 17 (7S; 1M; 9ML). Psychiatric disorders in 8 (depression was most frequent). Neurological disorders in 13 (5 neuromuscular). ENT/upper airway respiratory disorders in 8. Tumours in 7.

Conclusions: Present work confirms that at the time of sleep disorder diagnosis co-morbidities are commonly associated to OSAS independently of disease severity. The finding of this common association in non-severe cases of OSAS has strong implications on definition of best strategy of treatments in order to avoid patient health deterioration namely on metabolic status.

Assigned speakers:

Luis Silva, CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Gandra, PT

Assigned in sessions:

17.09.2014, 18:30-20:00, Poster, P9, Medical disorders and sleep, Poster Exhibition

Co-Morbidities in a Portuguese sample of Obstructive Sleep Apnoea Patients

A. Martins da Silva^{1,2}, L. Silva³, D. Cunha^{1,2}, J. Lopes¹, J. Ramalheira¹

¹ Serviço Neurofisiologia – Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal; ² UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; ³ CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Portugal.



BACKGROUND

Co-morbidities are a clinical problem in patients with Obstructive Sleep Apnoea Syndrome (OSAS). The identification of co-morbidities in OSAS patients, if any, is necessary for adequate treatment.

Diverse reports have been published identifying entities associated with OSAS.

The most common co-morbidities identified in OSAS are obesity, hypertension, diabetes and cardiovascular diseases.

As these entities are frequent in the general health population status, the association of such entities within OSAS patients, unavoidably creates multiple difficulties, not only for sleep respiratory problems, but also for all the other clinical problems.

The determination of which co-morbidities are more prevalent and how they interfere with the clinical diagnosis may give the clinician a possibility to discriminate between groups of potential outcomes, contributing to improvement in patient classification and consequently in better management of therapeutic strategies.

OBJECTIVES

The aim of the present study was the characterization of co-morbid condition in OSAS in a cohort of sleep disordered patients followed-up in a sleep outpatient clinic from the North of Portugal.

METHODS

- A cohort of **324** Sleep Disordered patients was consecutively evaluated. OSAS was confirmed after night sleep video-polygraphic recording (EEG/EOG/EMG/ECG/Nasal and Thoracic Respiration/O₂Saturation/Movement/ Behaviour) in **128** patients (111 Males/17 Females) Aged (mean): 54.6 (54.4/55.7) years.
- Co-morbidities: obesity (BMI>30), high blood pressure (HBP), diabetes, cardiovascular (CV) disorders, psychiatric, dyslipidaemia, ENT and upper airway respiratory disorders, neurological/neuromuscular, were analysed as a function of OSAS severity measured by the Apnoea Hypopnoea Index (AHI).

RESULTS

- In the **128** Patients, OSAS was Severe (S:AHI>30) in **39** patients, Moderate (M:AHI-16-30) in **30**, Mild (ML: AHI>5-15) in **59**.
- 96** (80M/16F) of the **128** confirmed OSAS patients (**75%**) had co-morbidities. OSAS was Severe in **31** patients, Moderate in **22**, Mild in **43** (Fig.1).

- From the 96 OSAS patients with co-morbidities, **38 (40%)** had only one co-morbid situation. Twenty of these 38 patients (**55%**), had obesity.
- The rest of the co-morbid OSAS population (**60%**) presented more than one (and simultaneous) co-morbid symptom.

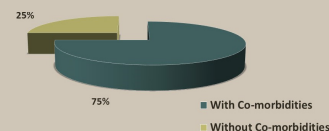


Fig. 1: Frequency of OSAS patients with and without co-morbidities

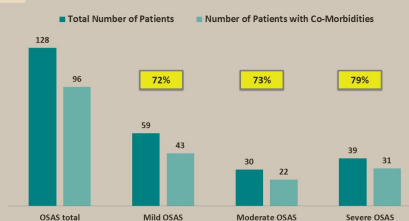


Fig. 2: Presence of Co-Morbidities by OSAS Severity

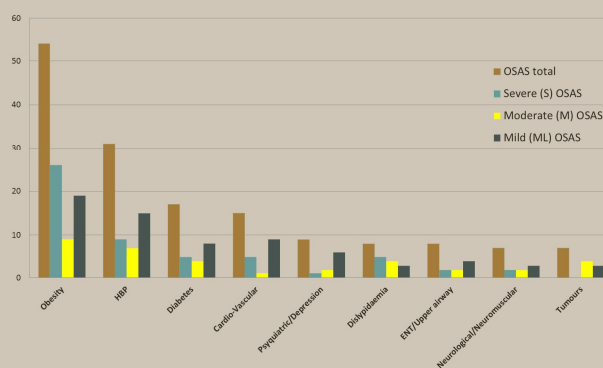


Fig. 3: Type of Co-morbidities present in different sub-sets of OSAS (by number of patients with the symptom)

Taking the overall population **with one or more co-morbidities**, the most common of them were (Fig.3):

- Obesity found in **54** patients (26S; 9M; 19ML), High Blood Pressure (HBP) in **33** (11S; 6M; 16 ML), diabetes in **17** (5S; 4M; 8ML), cardiovascular diseases in **15** (5S; 1M; 9ML). Psychiatric disorders in **9** (depression was most frequent), dyslipidaemia (without obesity) in **8** (1S; 4M; 3ML), ENT/upper airway respiratory disorders in **8**. Neurological disorders in **7** (5 neuromuscular) and Tumours in **7**.

CONCLUSIONS

The present work confirms that at the time of sleep disorder diagnosis **co-morbidities are commonly associated to OSAS independently of disease severity**. The finding of this common association, also in non-severe cases of OSAS, has strong implications on definition of best strategy of treatments of these patients.

8.3.4. Trabalhos apresentados no 5th World Congress on Sleep of the World Association of Sleep Medicine (WASM) em Valência 2013.

Sleep disorders diagnosis by genetic assessment

A. Martins-Da-Silva¹, J. Ramalheira¹, L. Silva³, D. Cunha², S. Brás², C. Carvalho²

¹Serviço Neurofisiologia, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto, ²UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, ³CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Gandra, Portugal

Introduction: Diagnosis of Sleep Disorders (SD) is frequently a difficult task. Environmental and genetic factors influence the clinical SD phenotype masking its correct identification. The definition of such factors will help the physicians to easily classify SD. Accordingly a better treatment for such disorders should be obtained. The objective of the present work is to identify, on a cohort of SD patients, the possible genetic factors involved.

Materials and methods: Four hundred and twenty-one SD patients were assessed at the Out Patient Sleep Clinic of Hospital Santo António/CH Porto – by means of clinical history, physical and neurological evaluation, night sleep polygraphic EEG-Video recording (EEG, EOG, EMG – chin and L Limbs; Respiratory effort; O₂ saturation; EKG; snoring). For Narcolepsy without (N) or with Cataplexy (NC) and for Hypersomnia (H) qualification/quantification a MSLT was performed on the day after night registration. Blood venous sample was taken after informed consent. Ethical approval was obtained for research studies. For the purpose of distinction between diverse Sleep Disorders HLA-DRB1* was genotyped using a PCR-Sequence Specific Primer (SSP) methodology. A control population (223 individuals) was matched to age, gender, ethnicity and geographical origin. Statistical analysis was performed and the phenotypic frequencies were evaluated by chi-square of 2 × 2 contingency tables. Odds Ratios and their respective 95% confidence interval were calculated. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results: From the 421 SD patients studied 302 were classified as obstructive sleep apnea syndrome (OSAS); 64 as H; 37 NC and 16 N. Significant values ($p < 0.05$) of HLA-DRB1* alleles were found to OSAS: HLA-DRB1*09 (1% OSAS vs. 6% PC); NC: HLA-DRB1*13 (14% NC vs. 30% PC) and 15 (76% NC vs. 21% PC); N: HLA-DRB1*15 (44% N vs. 21% PC); H: HLA-DRB1*03 (33% H vs. 15% PC).

Conclusion: Our studies emphasize that the HLA-DRB1* genetic characterization of SD patients may identify different profiles. The results point out to the identification of susceptibility alleles, HLA-DRB1*15 for N and NC and HLA-DRB1*03 for Hypersomnia. The frequencies of HLA-DRB1*09 in OSAS and of HLA-DRB1*13 in NC indicate that these alleles may act as protective factors. These findings point to the value of immunogenetic approach to a better understanding of the pathophysiology of SD and to a better classification of patients with sleep disorders.

Acknowledgement: *Studies on SAOS were granted by a CESPU Project.

Sleep Disorders Diagnosis by Genetic Assessment

Martins-da-Silva A^{1,3}, Ramalheira J¹, Silva L^{4*}, Cunha D^{2,3}, Brás S^{2,3}, Carvalho C^{2,3}

¹Serviço Neurofisiologia, Hospital Santo António/ CH Porto, ²Laboratório de Imunogenética/ICBAS, ³UMIB/ICBAS – Universidade do Porto, ⁴CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde, Portugal

Background

Diagnosis of Sleep Disorders (SD) is frequently a difficult task. The major cause of complaint of these patients is their difficulty in maintaining desired wakefulness, or a complaint of an excessive amount of sleep. However environmental and genetic factors influence the clinical SD phenotype masking its correct identification. The definition of such factors will help the physicians to easily classify SD.

The determination of HLA (Human Leukocyte Antigen) class II genotype is widely used to confirm the diagnosis of SD ¹. The HLA genotyping is reliable, easy to perform and reassures the clinician. It is also less invasive than other methodologies and is in accordance with the autoimmune hypothesis for the origin of Narcolepsy ¹. This approach also gives the clinician a possibility to discriminate between groups of potential outcomes, contributing to improvement in patient classification and consequently in the management of therapeutic strategies.

AIM OF THE STUDY: To evaluate the contribution of HLA to the susceptibility for Sleep Disorders.

Patients and Methods

Patients

Four hundred and seventeen SD patients were assessed at the Out Patient Sleep Clinic of Hospital Santo António/CH Porto – by means of clinical history, physical and neurological evaluation, night sleep polygraphic EEG-Video recording (EEG, EOG, EMG – chin and L Limbs; Respiratory effort; O₂ saturation; EKG; snoring). For Narcolepsy without (N) or with Cataplexy (NC) and for Hypersomnia (H) qualification/quantification a MSLT was performed on the day after night recording. Blood venous sample was taken after informed consent. Ethical approval was obtained for research studies.

A control population (223 individuals) was used matched for age, gender, ethnicity and geographical origin.

Genotyping

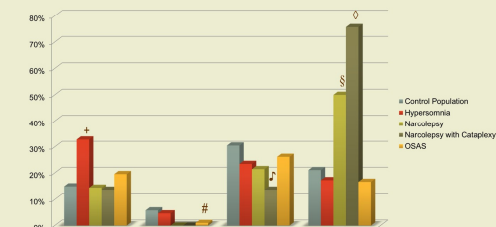
HLA-DRB1* genotyping was carried out using a *Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers* (PCR-SSP) methodology.

Statistical analysis

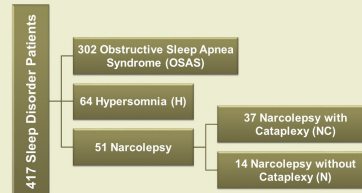
Phenotypic frequencies were evaluated by chi-square of 2x2 contingency tables. Odds Ratios and their respective 95% confidence interval were calculated. Values of p<0.05 were considered as statistically significant.

		HLA-DRB1*03	HLA-DRB1*09	HLA-DRB1*13	HLA-DRB1*15
Control Population (n=223)	n	33	13	68	47
	%	15%	6%	30%	21%
Hypersomnia (n=64)	n	21	3	15	11
	%	33%	5%	23%	17%
	p	0,00115 +	0,7256	0,2725	0,4947
Narcolepsy (n=14)	n	2	0	3	7
	%	14%	0%	21%	44%
	p	0,6695	0,9449	0,6437	0,03618 §
Narcolepsy with Cataplexy (n=37)	n	5	0	5	28
	%	14%	0%	14%	76%
	p	0,8377	0,1319	0,03329 ¶	1,13E-11 ◇
OSAS (n=302)	n	59	3	79	50
	%	20%	1%	26%	17%
	p	0,1568	0,001439 #	0,2743	0,1872

Table1: Alleles of HLA-DRB1* that are significantly associated with sleep disorders



Graph 1: HLA-DRB1*03, DRB1*09, DRB1*13 and DRB1*15 phenotype frequencies in sleep patients (H, N, NC and OSAS) and CP



Results

- A significantly higher frequency of HLA-DRB1*03 allele was observed in Hypersomnia patients (33% H vs. 15% CP, p= 0,00115). No differences were observed for the other sleep disorders.
- We also found a significant association between HLA-DRB1*15 and Narcolepsy, with and without Cataplexy. 44% N vs. 21% CP, p=0,03618 and 76% NC vs. 21% CP, p= 1,13E-11.
- The frequency of HLA-DRB1*13 was lower in patients with NC (14% NC vs. 30% CP, p=0,03329). In the same way a lower frequency of HLA-DRB1*09 was observed in OSAS patients (1% OSAS vs. 6% CP, p=0,001439).
- No statistic significant differences in frequencies of other HLA-DRB1* alleles was found between patients and controls (data not shown in table).

Comments

- Our studies emphasize that HLA-DRB1* genetic characterization of SD patients may help to identify different clinical profiles.
- These results provide evidence for the existence of susceptibility alleles, HLA-DRB1*15 for N and NC and HLA-DRB1*03 for Hypersomnia.
- The frequencies of HLA-DRB1*09 in OSAS and of HLA-DRB1*13 in NC indicate that these alleles may act as protective factors.
- These findings highlight the value of an immunogenetic approach for a better understanding of the pathophysiology of SD and a better classification of patients with sleep disorders.

REFERENCES 1 - Martins da Silva (2013). How genetic characterization of Narcolepsy and hypersomnia is useful on phenotype definition. Rev Neurol 57(1):38.

Acknowledgements

*Studies on SAOS were granted by a CESPU Project

8.3.5. Trabalhos apresentados no 20nd Congress of the European Sleep Research Society (ESRS) em Lisboa 2010.

Sleep disorders

Wednesday, September 15, 2010, 12:00 - 13:30

The serotonin HTR2A receptor 102 T>C gene polymorphism may play a role in the susceptibility to sleep disorders in the Portuguese population

S. Maia, C. Carvalho, B. Leal, A. Martins da Silva, J. Lopes, H. Rodrigues, A. Azevedo, L. Martins da Silva, P. Esteves, B. Martins da Silva, P. Costa (Porto, Gandra, PT)

Objective: To assess the role of the HTR2A gene 102 T>C polymorphism (rs6313) in the susceptibility to sleep disorders, in the northern Portuguese population.

Methods: Genetic association case/control study including 89 patients with sleep disorders (SD) [narcolepsy, idiopathic hypersomnia and sleep obstructive apnoea syndrome] recruited at the sleep outpatient clinic of Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto, and a control cohort of 40 unrelated healthy individuals (HI) from northern Portugal. The HTR2A 102 T>C polymorphism was assayed by PCR-RFLP with the restriction enzyme MspI.

Results: The 102TT genotype was significantly underrepresented in the SD sample in relation to HI (33% vs. 53% respectively, $p = 0.032$, O.R. = 0.44 [0.20 – 0.64]. This difference was even larger when the 12 narcoleptic patients, which may represent a distinct genetic entity, were excluded (29% vs. 53%).

Conclusion: HTR2A belongs to the large family of metabotropic serotonin (5-hydroxytryptamine, 5 HT) receptors. 5-HT is a neurotransmitter that plays a key role in the regulation of diverse brain functions, including different aspects of breathing, sleep, cognition and affection. The HTR2A receptors have been implicated in several of those functions, and also in the maintenance of upper airways' stability. They are considered a promising therapeutic target for primary and secondary management of sleep disorders. The HTR2A 102 T>C polymorphism is silent, but may alter the HTR2A transcript stability and/or translational efficiency, lowering the expression level of this receptor. Our results, while preliminary, lend support to this hypothesis, and warrant further exploration in a larger cohort of patients. Finally, the heterogeneity of this diverse array of pathologies seems to have a correspondence in the spread of the observed genetic frequencies, and will have to be taken into account in future genetic association studies.

Work partially supported by a Grant from CITS-Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde – CESPU – Portugal.






THE SEROTONIN HTR2A RECEPTOR 102 T>C GENE POLYMORPHISM MAY PLAY A ROLE IN THE SUSCEPTIBILITY TO SLEEP DISORDERS IN THE PORTUGUESE POPULATION

Sandra Maia¹, Bárbara Leal¹, Sara Fonseca¹, Paulo P Costa², João Lopes³, Luís M Silva⁴, Pedro J Esteves⁴, Berta M Silva¹, António M Silva^{1,3}

¹UMIB e Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; ²Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA, Porto, Portugal; ³Serviço Neurofisiologia – Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal; ⁴Centro de Investigação em Tecnologia e Saúde – CESPU, Portugal;



Introduction

Disturbances of sleep are highly prevalent in all societies around the world and are associated with cognitive and emotional impairments. Based on clinical and experimental data the serotonergic system, and particularly serotonin receptor-2 subtypes have recently emerged as among the most promising targets in the search for effective and well-tolerated novel medications for treating sleep disorders. Serotonin (5-hydroxytryptamine - 5-HT) is a neurotransmitter and neuromodulator that regulates many brain functions, including different aspects of sleep, cognition, memory, mood and breathing control, and also modulates upper airways muscular tone. Animal studies have shown an elevation in 5-HT brain levels during periods of sleep deprivation. It was also demonstrated that 5-HT_{2A} plays an inhibitory role in non-REMS (Rapid Eye Movement Sleep) expression. Various studies indicate that this receptor is involved in the physiopathology of psychiatric disorders associated with sleep disturbances such as depression. These clinical phenotypes have been associated with a polymorphism – 102 T>C (rs6313) - in the HTR2A gene.

Aim: To assess the role of the HTR2A gene 102 T>C polymorphism (rs6313) in the susceptibility to sleep disorders, in the northern Portuguese population.

Patients and Methods

Population Selection

➤ Eighty-nine patients with sleep disorders (SD) [narcolepsy, idiopathic hypersomnia and sleep obstructive apnea syndrome] recruited at the sleep outpatient clinic of Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto were compared to a cohort of 74 unrelated healthy individuals (HI) from northern Portugal.

Methods

➤ Clinical evaluation was complemented with night sleep video-polygraphic recording: EEG / EOG / ECG / Nasal and Thoracic Respiration / O₂Saturation / Movement / EMG - chin and LL for PML assessment; followed up by MSLT when necessary for hypersomnia/narcolepsy diagnosis.

➤ Genomic DNA was obtained from Proteinase-K treated peripheral blood leukocytes using a "salting out" procedure².

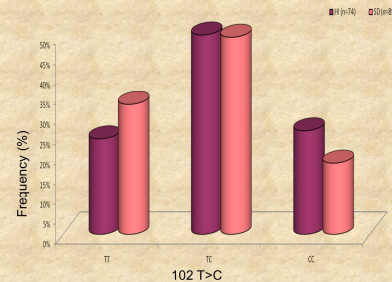
➤ The HTR2A 102 T>C polymorphism was assayed by PCR-RFLP with the restriction enzyme MspI.

Statistical Analysis

➤ Phenotypic frequencies were obtained by direct counting and statistical comparisons were evaluated by contingency table analysis. Odds Ratios (OR) and their respective 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Values of p<0.05 were considered as statistically significant.

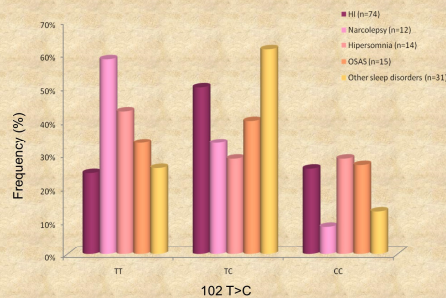
Results

➤ The frequency of 102TT genotype was higher in the SD sample when compared to HI (33% vs. 24% respectively, p = n.s. (graphic 1)).



Graphic 1 – 102 T>C genotypic frequencies in sleep disorders patients and healthy individuals

➤ The higher frequency of the 102TT genotype was statistically significant when narcolepsy alone was considered (58% vs. 24% respectively, p=0.016 OR=4.46 [1.23 – 15.4]) (graphic 2), but not for other patient groups.



Graphic 2 – 102 T>C genotypic frequencies in the different sleep pathologies and in control population

Comments

Our results suggest that the 5-HT_{2A} 102 TT genotype may play a role in susceptibility for narcolepsy, and perhaps also for other sleep disorders. The HTR2A 102 T>C polymorphism is silent, but may alter the HTR2A transcript stability and/or translational efficiency, lowering the expression level of this receptor, reducing the serotonergic neurotransmission, thus changing normal brain functions. Our results, while preliminary, lend support to this hypothesis, and warrant further exploration in larger cohorts of patients. Finally, the heterogeneity of this diverse array of sleep pathologies seems to have a correspondence in the spread of the observed genetic frequencies, and will have to be taken into account in future genetic association studies.

References

1. LeDoux HP, Vistica R. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *European Journal of Neuroscience* (2009); 25:1766–1809.
2. Papp D, Lencz C, et al. Contribution of 5-HT₂ receptor subtypes to sleep-wakefulness and respiratory control and functional adaptations to knock-out misclacking 5-HT_{2A} receptors. *The Journal of Neuroscience* (2005); 25(49):1231–38.
3. Penata RG, Lencz H, et al. Effect of sleep and sleep deprivation on serotonergic neurotransmission in the hippocampus: a combined in vivo microdialysis/EEG study in rats. *European Journal of Neuroscience* (2003); 17:1896–1906.
4. Tizabi M, Yildirim A, et al. Association of serotonin transporter gene polymorphism with obstructive sleep apnea syndrome. *The Laryngoscope* (2005); 115:832–36.
5. Sakai K, Taki T, Nakayama H, et al. Serotonin_{2A} and 2C receptor gene polymorphisms in Japanese patients with obstructive sleep apnea. *Internal Medicine* (2005); 44(9):829–33.

Methods

Saturday, September 18, 2010, 13:00 - 14:30

Does genetic information contribute to sleep disorders diagnosis?


C. Carvalho, S. Maia, S. Fonseca, A. Bettencourt, B. Leal, P. Costa, I. Paiva, M. Quintas, J. Lopes, J. Ramalheira, L. Martins da Silva, P. Esteves, B. Martins da Silva, A. Martins da Silva (Porto, Gandra, PT)

Objective: Sleep disorders are characterized by abnormal sleep structure, not only per se but also strongly influenced by environmental and genetic factors. One of the strongest association described is between narcolepsy and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 genotype, reported up to 95% in some series. In this study we investigate if HLA class II DRB1* and DQB1* 0602 alleles contributes for the differential diagnosis in different sleep disorders such as narcolepsy, hypersomnia and obstructive sleep apnoea.

Materials and methods: One hundred and nine patients referred to the Sleep Outpatient Clinic - St. Antonio Hospital have been studied (clinical evaluation; night sleep video-polygraphic recording: EEG/EOG/ ECG/ Nasal and Thoracic Respiration/O2Saturation/ Movement/EMG - chin and LL for PML assessment; followed up by MSLT when necessary for hypersomnia/narcolepsy diagnosis. Genomic DNA was obtained from peripheral venous blood by salting-out procedure and HLA genotyping was performed using a PCR methodology with sequence-specific primers (PCR-SSP). Patients groups were compared to a control population (healthy individuals) from the same region. Chi-Square and Fisher's exact test were used to evaluate differences in frequencies.

Results: Patients by group: SAOS (n=35); Narcolepsy (n=11), Hypersomnia (n=15); others (including PML) (n=48). All patients (n=109); Control Population (n=218). HLA frequencies: DRB1*15 (SAOS 14.3%; Narcolepsy 63.6%; Hypersomnia 23.0%; Others 16.1%; All patients - 22.9%; Controls 19.9%); DQB1*0602 (SAOS 8.6%; Narcolepsy 63.6%; Hypersomnia 20.0%; Others 16.7%; All patients 17.4%; Controls 11.0%); DRB1*03 (SAOS 28.6%; Narcolepsy 18.2%; Hypersomnia 22.2%; Others 20.8%; All patients 24.8%; Controls 15.6%). DRB1*13 (SAOS 28.6%; Narcolepsy: 0.0%; Hypersomnia 23.7%; Others 25.0%; All patients 22.9%; Controls 29.8%). DRB1*03 is overrepresented in all but narcolepsy groups, significantly in SAOS (p=0.05). DQB1*0602 frequency is significantly increased in narcoleptics (p=10⁻⁵). The significant value found for DRB1*15 (p=0.001) is due to LD (linkage disequilibrium) with DQB1*0602. Interestingly the HLA DR*13 allele is absent in the narcoleptic group of patients.


Conclusions: HLA studies including DQ alleles identification are useful, not only for sleep disorders diagnostic purposes (Narcolepsy), but could also be helpful on distinction between groups, contributing for improvement in diagnostic classification and consequently therapeutic strategies.



DOES GENETIC INFORMATION CONTRIBUTE FOR SLEEP DISORDERS DIAGNOSIS?

Berta Martins da Silva¹, Sandra Maia¹, Sara Fonseca¹, Cláudia Carvalho¹, Andreia Bettencourt¹, Paulo P Costa², Isaías Paiva³, Mónica Almeida³, João Lopes³, Luís M Silva⁴, Pedro J Esteves⁴, António Martins da Silva^{1,3}

¹UMIB and Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; ²Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA, Porto, Portugal; ³Serviço Neurofisiologia – Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal; ⁴Centro de Investigação em Tecnologia e Saúde – CESPU, Portugal;



Introduction

Sleep disorders (SD) are characterized by abnormal sleep structure, with a complex etiopathogenesis, strongly influenced by environmental and genetic factors. These disorders, (like narcolepsy, restless legs syndrome, obstructive sleep apnea syndrome (OSAS)) , per se, or as a result of sleep deprivation, interfere with work, driving, and social activities.

One of the strongest genetic associations described for sleep disorders is between narcolepsy and the MHC class II HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 haplotype, reported in 70% to 95% of patients in some series¹.

In this study we investigate if the HLA-DRB1 genotype, and also the DQB1*0602 allele status, contribute for the differential diagnosis in different sleep disorders such as narcolepsy, hypersomnia and obstructive sleep apnea.

Patients and Methods

Population Selection

➤ A consecutive cohort referred to the Sleep Outpatient Clinic at Stº Antonio Hospital was used, from which 269 patients were selected following the exclusion of major co-morbidities.

Methods

➤ Clinical evaluation was complemented with night sleep video-polygraphic recording: EEG / EOG / ECG / Nasal and Thoracic Respiration / O2Saturation / Movement / EMG - chin and LL for PML assessment; followed up by MSLT when necessary for hypersomnia/narcolepsy diagnosis.

➤ Genomic DNA was obtained from Proteinase-K treated peripheral blood leukocytes using a "salting out" procedure².

➤ HLA-DR was genotyped using a PCR-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) methodology³.

Statistical Analysis

➤ Phenotypic frequencies were obtained by direct counting and statistical comparisons were evaluated by chi-square of 2x2 contingency tables. Odds Ratios (OR) and their respective 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

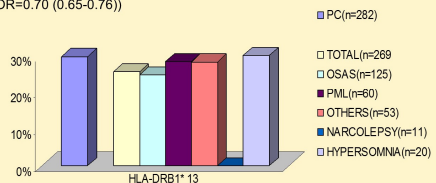
Results

➤ The HLA DRB1*09 frequency was significantly decreased in the 269 patients with sleep disorders compared with the control population (1% vs. 5%; $p = 0.029$; OR=0.29 (0.09-0.89)).

Table 1 – HLA-DRB1 alleles frequencies in SD and healthy controls

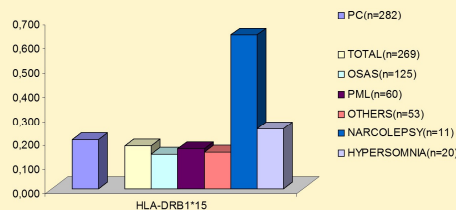
HLA-DRB1 Alleles	SD (n=269)	Controls (n=282)	OR (95%CI) SD vs. Controls	p ^a
*01	22%	23%	0.939 (0.63-1.39)	0.759
*03	20%	16%	1.390 (0.89-2.15)	0.136
*04	20%	24%	0.793 (0.53-1.18)	0.258
*07	31%	26%	1.301 (0.89-1.88)	0.165
*08	10%	9%	1.199 (0.67-2.13)	0.537
*09	1%	5%	0.288 (0.09-0.88)	0.022
*10	2%	4%	0.562 (0.20-1.54)	0.257
*11	21%	20%	1.109 (0.73-1.68)	0.623
*12	3%	3%	0.929 (0.35-2.44)	0.883
*13	26%	30%	0.813 (0.55-1.18)	0.278
*14	6%	6%	0.920 (0.45-1.88)	0.821
*15	18%	20%	0.857 (0.55-1.31)	0.479
*16	5%	5%	1.136 (0.52-2.46)	0.747

➤ The HLA-DRB1*13 allele was absent in the narcoleptic group (0% vs. 29.8%; $p = 0.037$; OR=0.70 (0.65-0.76))



Graphic 1 – Frequencies of HLA-DRB1*13 allele in SD groups and control population

➤ The HLA-DRB1*15 frequency was significantly increased in the narcoleptic group (63.6% vs. 19.8%; $p = 0.003$; OR=7.06 (1.99-24.96)).



Graphic 2 – Frequencies of HLA-DRB1*15 allele in SD groups and control population

Comments

HLA studies in sleep disorders are useful, not only for diagnostic purposes (Narcolepsy), but possibly also to discriminate between groups, contributing to improvement in patient classification and consequently in the management of therapeutic strategies. This study shows that the HLA-DRB1*15 allele is associated with Narcolepsy in Portuguese patients, confirming previous findings in independent cohorts, and so reinforces the importance of this polymorphism as a genetic marker for the disease. Despite geographical HLA variation, the absence of HLA-DRB1*13 allele in the narcoleptic group, in our region, lends support to the hypothesis that Narcolepsy is an autoimmune disease. Previously, we have found that this allele could confer protection to some "classical" AIDs (SLE, RA and MS)⁴. Further candidate gene association and linkage studies of sleep disorders will help to establish the research schedule for future studies.

References

- Mignot, E., Lin, L., Rogers, W., Honda, Y., Gu, X., Lin, X. et al (2001) Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 686-699
- Miller SA, Dykes DO, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215
- Olivero O, Zetterqvist H (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching. *Tissue Antigens* 39: 235-245
- Claire Ferreira, Bárbara Leal, Cláudia Carvalho, Andreia Bettencourt, Sara Camarin, Ana Martins da Silva, António Martins, Paulo Barroso, Carlos Vasconcelos, Paulo P Costa, Berta Martins Silva. (2007) "Evidence for the Presence of a Common Protective DRB1 Allele for AID in the Portuguese Population". *Tissue Antigens* 68(5):464-465

Obstructive sleep apnoea IV

Saturday, September 18, 2010, 13:00 - 14:30

Genetic characterization of ApoE in sleep disorders patients from north of Portugal

L. Martins da Silva, A. Bettencourt, P. Esteves, S. Fonseca, P. Costa, J. Ramalheira, C. Moreira, B. Martins da Silva, A. Martins da Silva (Gandra, Porto, PT)

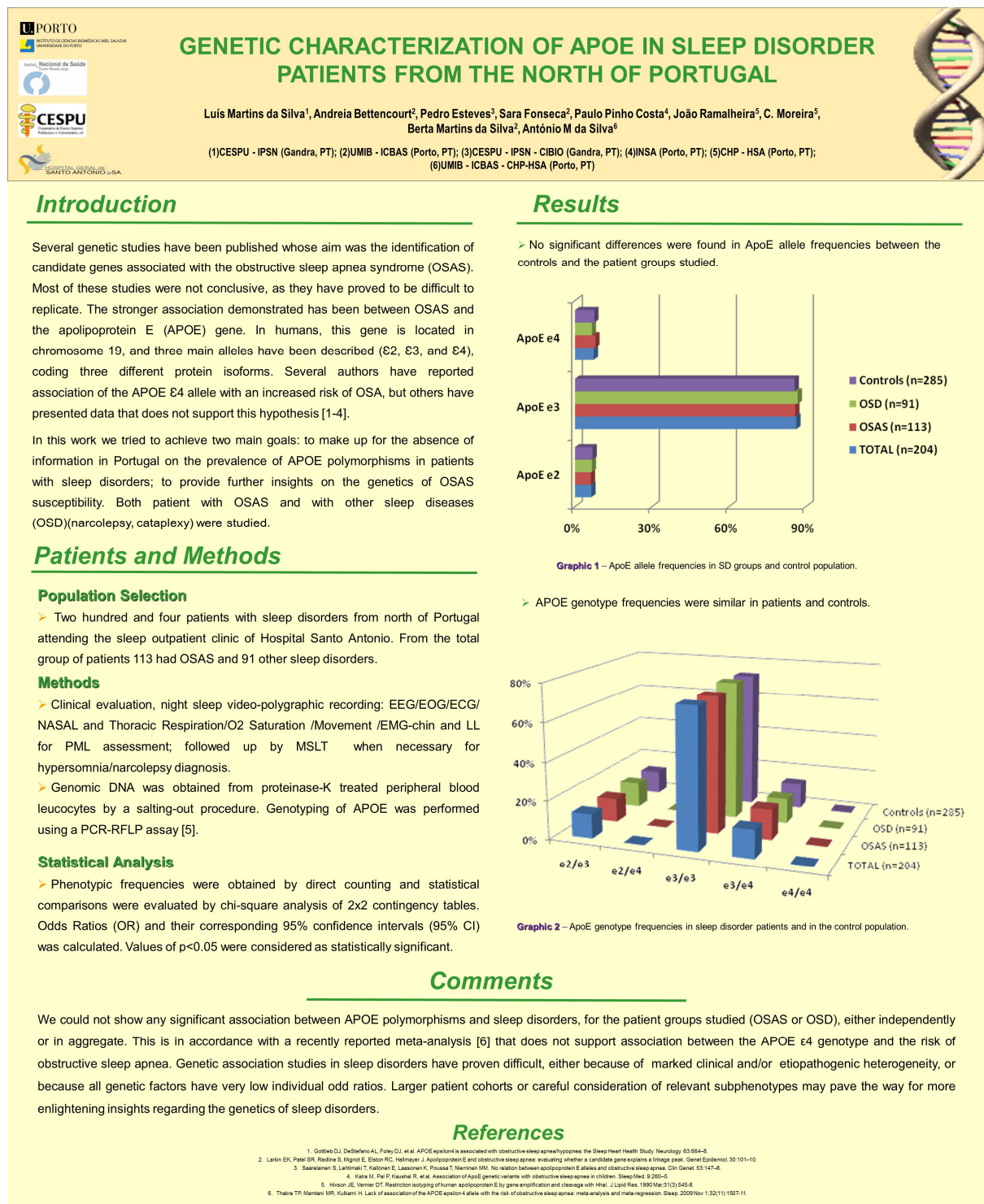
Objectives: The information about the involvement of the ApoE lipoprotein, a vital macromolecule in cholesterol metabolism, in Portuguese patients with sleep disorders is scarce if any. In order to contribute to its knowledge we identify the APOE polymorphisms in patients with OSAS (Obstructive Sleep Apnea) and other sleep disorders. The human APOE gene is located on chromosome 19 and three alleles have been described (sigma 2, sigma 3, and sigma 4), which encode three major isoforms. In sleep research conflicting results were reported between the presence of APOE sigma 4 allele and OSAS. In this study we evaluate possible associations between APOE alleles in patients with different sleep disorders.

Methods: Forty seven patients referred to the Sleep Outpatient Clinic - Stº Antonio Hospital have been studied (clinical evaluation; night sleep video-polygraphic recording: EEG/EOG/ ECG/ Nasal and Thoracic Respiration/O2Saturation/ Movement/EMG - chin and LL for PML assessment; followed up by MSLT when necessary for hypersomnia/narcolepsy diagnosis. A previously studied cohort was used as control population (Rodrigues et al., 2005). Genotyping of APOE was performed using a PCR-RFLP assay. Chi-Square and Fisher's exact test were used to evaluate different frequencies.

Results: Among the group of 47 patients studied, 25 suffered from Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS); 22 patients exhibit other sleep disorders (OSD) - PLM, snoring without apnea, hypersomnia and one patient with narcolepsy. We estimated alleles frequency and statistical tests were used to compare individual groups – OSAS and OSD group - and the all patients group to control population (494 health individuals from the same country region). No significant differences were found between the control group and the three patients groups studied, the OSAS group or the OSD patients on all APOE (sigma 2, sigma 3, and sigma 4) alleles.

Conclusions: This study does not show any significant association between the APOE polymorphisms with OSAS or OSD. This is in accordance with recent reported meta-analysis (Thakre et al., 2009) that do not support causal association between APOE sigma 4 allele and the risk of obstructive sleep apnea.

Work partially supported by a Grant from CITS-Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde – CESPU – Portugal



8.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GENES CANDIDATOS E SNPs SELECIONADOS EM FUNÇÃO DOS FENÓTIPOS

<u>GENE</u>	<u>SNP</u>	<u>Fenotipo associado</u>
ACE	rs4291	Obesidade
ACE	rs4343	Obesidade
ADIPOQ	rs1501299	Obesidade
ADIPOR1	rs7539542	Obesidade
ADIPOR2	rs767870	Obesidade
AKAP11	rs9594738	Estrutura craniofacial
APOE	rs405509	Outros
APOE	rs429358	Outros
APOE	rs7412	Outros
APOE	rs769450	Outros
CAPN10	rs2975760	Outros
CAPN10	rs3792267	Outros
CAPN10	rs41266971	Outros
CAPN10	rs5030952	Outros
CKM	rs1133190	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs123187	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs17875644	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs17875646	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs344816	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs4884	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs639783	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs7260359	Estrutura dos tecidos moles
CKM	rs7260463	Estrutura dos tecidos moles
COLEC10	rs6469804	Estrutura craniofacial
COLEC10	rs6993813	Estrutura craniofacial
EDN1	rs10478694	Estrutura craniofacial
EDN1	rs1800541	Estrutura craniofacial
EDN1	rs5370	Estrutura craniofacial
FGF2	rs1048201	Estrutura craniofacial
FGF2	rs1449683	Estrutura craniofacial
FGFR2	rs1219648	Estrutura craniofacial
FGFR2	rs2981575	Estrutura craniofacial
FGFR2	rs3135715	Estrutura craniofacial
FTO	rs1421085	Obesidade
FTO	rs17817449	Obesidade
FTO	rs9939609	Obesidade
GABBR1	rs1805057	Outros
GABBR1	rs29230	Outros
GABBR1	rs29232	Outros
GNAS	rs6123832	Outros

GNAS	rs7121	Outros
GNAS	rs965808	Outros
IGF1	rs12579108	Estrutura dos tecidos moles
IGF1R	rs2229765	Estrutura dos tecidos moles
IGF2	rs680	Estrutura dos tecidos moles
IGFBP3	rs2854744	Estrutura dos tecidos moles
LEP	rs2167270	Obesidade
LEP	rs7799039	Obesidade
LEPR	rs1137101	Obesidade
LEPR	rs1805134	Obesidade
LEPR	rs8179183	Obesidade
MC4R	rs12970134	Obesidade
MC4R	rs17700633	Obesidade
MC4R	rs17782313	Obesidade
MMP1	rs1799750	Outros
MSTN	rs13420500	Estrutura dos tecidos moles
MSTN	rs16832285	Estrutura dos tecidos moles
MSTN	rs3187415	Estrutura dos tecidos moles
MYH6	rs365990	Outros
MYH6	rs7153499	Outros
MYH7	rs12433901	Outros
PON1	rs705382	Outros
PON1	rs757158	Outros
PON1	rs854560	Outros
PON1	rs854571	Outros
PON1	rs854573	Outros
PPARG2	rs10865710	Obesidade
PPARG2	rs1801282	Obesidade
PPARGC1A	rs8192678	Obesidade
SERPINE1	rs1799889	Obesidade
SERPINE1	rs2227631	Obesidade
SERPINE1	rs2227674	Obesidade
TCOF1	rs15251	Estrutura craniofacial
TCOF1	rs2255796	Estrutura craniofacial
TCOF1	rs2569062	Estrutura craniofacial
TGFB1	rs12461895	Estrutura craniofacial
TGFB1	rs2241715	Estrutura craniofacial
TGFB1	rs4803455	Estrutura craniofacial
TGFB1	rs8179181	Estrutura craniofacial
TGFBR1	rs1626340	Estrutura craniofacial
TGFBR1	rs868	Estrutura craniofacial
TGFBR2	rs1036095	Estrutura craniofacial
TGFBR2	rs1078985	Estrutura craniofacial
TGFBR2	rs3087465	Estrutura craniofacial



TGFBR2	rs4522809	Estrutura craniofacial
TGFBR2	rs6785358	Estrutura craniofacial
TNFRSF11A	rs3018362	Estrutura craniofacial
TNFSF11	rs9594759	Estrutura craniofacial



8.5. INFORMAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS SELECIONADOS

A) Genes associados à Obesidade

É conhecida a importância da obesidade na SAOS, aumentando em 10 a 14 vezes o risco desta patologia, enquanto que a perda de peso reduz o risco para essa condição (Sanders e Redline, 1999). Assim, dos mais de 300 genes e regiões cromossômicas conhecidas como associadas ao fenótipo de obesidade os que seguidamente se enunciam têm sido apontados como fortes candidatos.

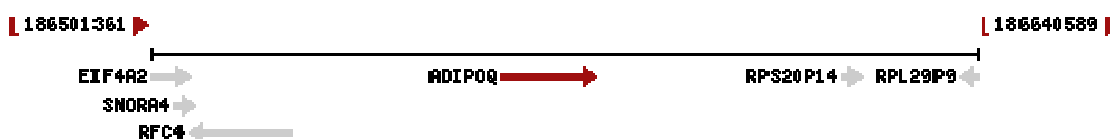
A.1) ACE

Este gene está localizado no cromossoma 17q23.3 e codifica uma enzima envolvida na catalisação da conversão da angiotensina I em angiotensina II, um peptídeo fisiologicamente activo. A angiotensina II é um potente vasopressor e um peptídeo estimulante da aldosterona que controla a pressão arterial e do equilíbrio hidroelectrolítico. Esta enzima desempenha um papel fundamental no sistema renina-angiotensina. Muitos estudos têm associado a presença ou ausência de um elemento de repetição Alu 287 bp neste gene com os níveis de enzima circulantes ou com fisiopatologias cardiovasculares.



A.2) ADIPOQ

Este gene localiza-se no cromossoma 3q27 e é expresso exclusivamente no tecido adiposo. Ele codifica uma proteína com similaridade com colágenos VIII e X e com o fator de complemento C1q. A proteína codificada circula no plasma e encontra-se envolvida nos processos metabólicos e hormonais. Mutações neste gene estão associadas com a deficiência de adiponectina. Múltiplas variantes, alternativamente emendadas, que codificam a mesma proteína, foram entretanto identificadas



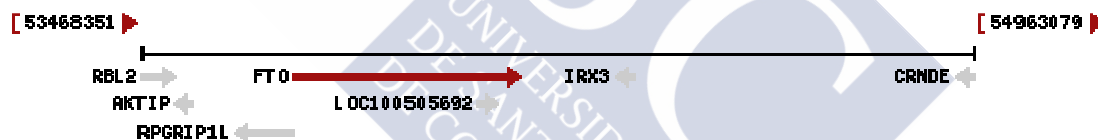
A.3) ADIPOR1/ADIPOR2

Os recetores de adiponectina, ADIPOR1 e ADIPOR2, são codificados respetivamente pelos genes ADIPOR1 (cromossoma 1q32.1) e ADIPOR2 (cromossoma 12 p13.33) e atuam como recetores de adiponectina globular e mediam o aumento da AMPK e PPAR-alfa. As actividades ligantes, bem como a oxidação de ácidos gordos e captação de glicose pela adiponectina



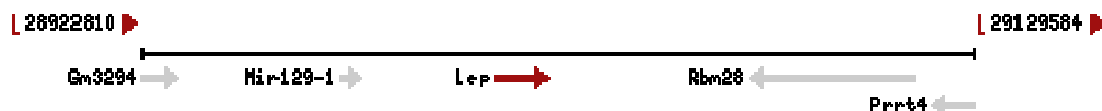
A.4) FTO

O gene FTO (Fat Mass and Obesity) está localizado no cromossoma 16q12.2. A função exacta deste gene ainda é desconhecida, mas existe uma relação conhecida entre o índice de massa corporal e a obesidade associada através deste genótipo. Tem sido reportado como um gene de susceptibilidade para a obesidade e responsável pelo controlo do apetite.



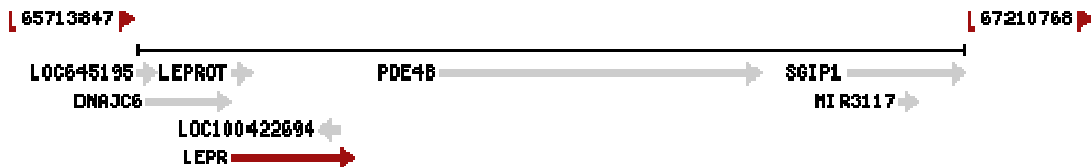
A.5) LEP

Este gene localiza-se no cromossoma 7q31.3 e codifica uma proteína que é secretada pelo tecido adiposo branco, e que desempenha um papel importante na regulação do peso corporal.



A.6) LEPR

O gene encontra-se localizado no cromossoma 1p31. Esta proteína é um receptor da leptina (uma hormona específica dos adipócitos que regula o peso corporal), e está envolvida na regulação do metabolismo da gordura. Mutações neste gene têm sido associadas com a obesidade e a disfunção pituitária



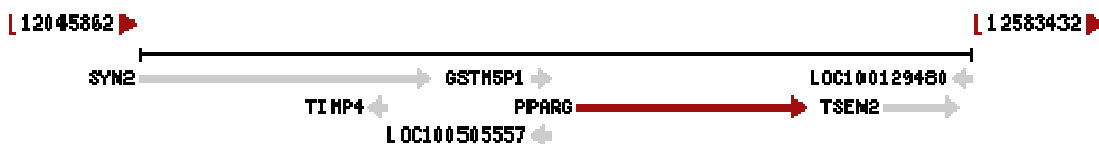
A.7) MC4R

O gene do recetor da Melanocortina 4 está localizado no cromossoma 18q22 e codifica uma proteína que interage com a hormona ACTH e MSH e é mediada por proteínas G. Alterações neste gene são a causa da obesidade autossómica dominante.



A.8) PPARG2

Este gene localizado no cromossoma 3p25 codifica um membro do receptor de peroxissoma proliferador-activado (PPAR), da subfamília de receptores nucleares. Três subtipos de PPARs são conhecidos: PPARalfa, PPAR-delta e PPAR-gama. A proteína codificada por esse gene PPAR-gama é um regulador da diferenciação dos adipócitos. Além disso, o PPAR-gama tem sido implicado na fisiopatologia de inúmeras doenças, incluindo obesidade e diabetes



A.9) SERPINE1

Este gene localizado no cromossoma 7q22.1 codifica um membro do inibidor de protease de serina (serpin) superfamília. Esse membro é o principal inibidor do activador do plasminogênio (tPA) e uroquinase (UPA), e, portanto, é um inibidor da fibrinólise. Alterações neste gene são a causa da deficiência de inibidor do activador do plasminogênio-1, e altas concentrações do produto do gene está associado com trombofilia



B) Genes associados à Estrutura dos Tecidos Moles

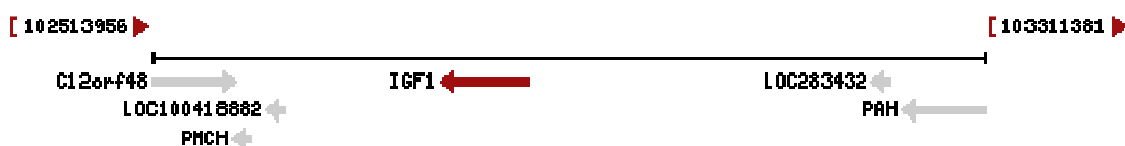
B.1) CKMM

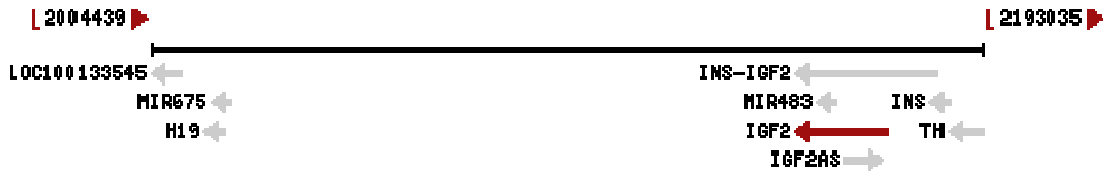
A proteína codificada por este gene localizado no cromossoma 19q13.32 é uma enzima citoplasmática envolvida na homeostase de energia e é um marcador importante para enfarte do miocárdio.



B.2) IGF1/IGF2

As proteínas codificadas por estes genes, localizados respectivamente nos cromossomas 12q23.2 e 11p15.5 são semelhantes à insulina em função e estrutura e são membros de uma família de proteínas envolvidas na mediação de crescimento e desenvolvimento.





B.3) IGF1R

Esse receptor codificado pelo gene IGF1R localiza-se no cromossoma 15q26.3. e desempenha um papel crítico em eventos de transformação.



B.4) IGFBP3

Este gene é um membro da ligação às proteínas (IGFBP) da família do factor de crescimento, semelhante à insulina e codifica uma proteína com um domínio de IGFBP e um tiroglobulina tipo I domínio. A proteína forma um complexo ternário, com o factor de crescimento de subunidade lábil ao ácido do tipo insulina (IGFALS) e qualquer factor de crescimento semelhante a insulina (IGF) I ou II. Nesta forma, circula no plasma, prolongando a semi-vida do IGF e alterando a sua interacção com receptores da superfície celular. Localiza-se no cromossoma 7p13-p12



B.5) MSTN

Este gene localizado no cromossoma 2q32.2 codifica uma proteína secretada que regula negativamente o crescimento do músculo-esquelético.



C) Genes associados à Estrutura Estrutura Craniofacial

C.1) AKAP11

As proteínas de ancoragem de Kinase-A (AKAPs) são um grupo de proteínas estruturalmente diversos, que têm a função comum de se ligarem à subunidade reguladora da proteína kinase A (PKA) e confinando a holoenzima a locais discretos dentro da célula. Este gene codifica um membro da família AKAP. A proteína codificada é expressa em níveis elevados durante a espermatogénese e em espermatozóides maduros. Ela liga as subunidades do RI e RII de PKA no testículo. Pode servir como função no controlo do ciclo celular de ambas as células somáticas e germinais em complemento ao seu papel putativo na função de espermatogénese e esperma.

Localiza-se no cromossoma 13q14.11:



C.2) COLEC10

Este gene localizado no cromossoma 8q24.12 codifica um membro da família C-lectinas, proteínas que possuem sequências de colágeno e domínios de reconhecimento de carboidratos.



C.3) EDN1

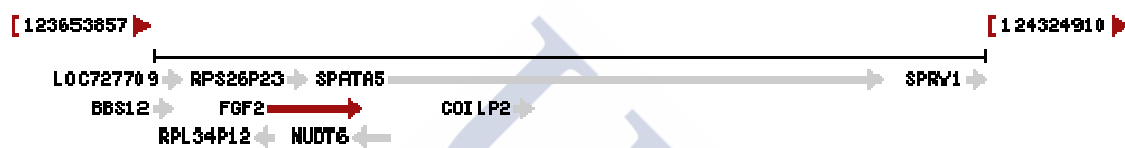
A proteína codificada por este gene localizado no cromossoma 6p24.1 é proteoliticamente processada para libertar um peptídeo secretado denominada endotelina 1.

Este peptídeo é produzido por células endoteliais vasculares. Endotelina-1 também afeta o sistema nervoso central.



C.4) FGF2

A proteína codificada por este gene localizado no cromossoma 4q26 é um membro do factor de crescimento da família de fibroblastos (FGF). Esta proteína tem sido implicada em diversos processos biológicos, como membro e desenvolvimento do sistema nervoso.



C.5) FGFR2

Membros da família FGFR diferem um dos outros nas suas afinidades ligantes e distribuição de tecidos. Mutações neste gene localizado no cromossoma 10q26, estão associadas com síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, craniossinostose, a síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, Beare-Stevenson Cútis Gyrata síndrome, síndrome de Saethre-Chotzen e craniossinostose.



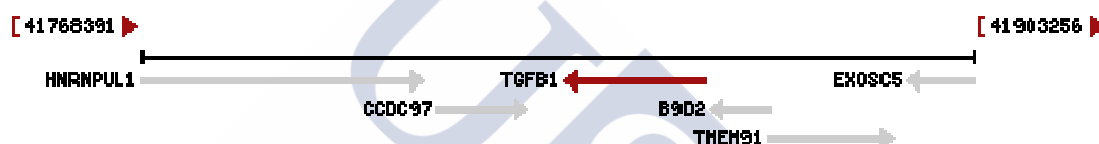
C.6) TCOF1

Mutações neste gene localizado no cromossoma 5q32, têm sido associadas com síndrome de Treacher Collins, uma desordem que inclui o desenvolvimento craniofacial anormal.



C.7) TGFB1

Este gene localizado no cromossoma 19q13.1, codifica um membro do factor de crescimento da família das citocinas, que são peptídeos multifuncionais que regulam a proliferação, diferenciação, adesão, migração e outras funções em muitos tipos de células. Muitas células possuem receptores TGFB, proteína que regula positiva e negativamente muitos outros fatores de crescimento

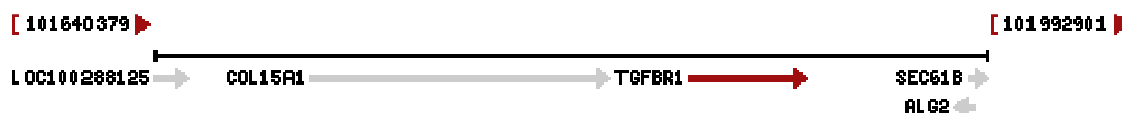


C.8) TGFBR1

TGFBR1

A proteína codificada por este gene forma um complexo heteromérico de receptores tipo II TGF-beta quando ligado a TGF-beta, transdução do sinal de TGF-beta da superfície celular para o citoplasma. A proteína codificada é uma serina / treonina proteína kinase. Mutações neste gene estão associadas com a síndrome de aneurisma da aorta Loeys-Dietz (LDAS). Várias variantes de transcrição que codificam diferentes isoformas foram encontradas para este gene.

A sua localização topográfica no Cromossoma 9q22 ?? é a seguinte:



C.9) TGFBR2

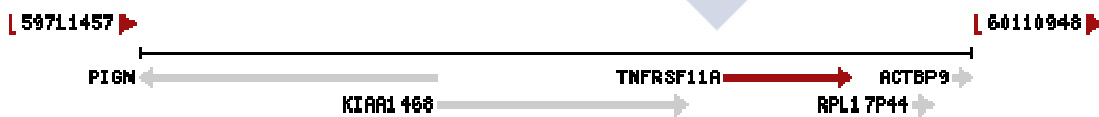
TGFBR2

Este gene codifica um membro da família de proteínas Kinase Ser / Thr e a subfamília do receptor de TGF β . A proteína codificada é uma proteína transmembranar que possui um domínio de proteína cinase, forma um complexo heterodimérico com uma outra proteína do receptor, e liga a TGF- β . Este complexo receptor / ligando fosforila proteínas, que, em seguida, entram no núcleo e regulam a transcrição de um subconjunto de genes relacionados com a proliferação celular. Mutações neste gene têm sido associados com a Síndrome de Marfan, aneurisma da aorta Loeys-Deitz, e o desenvolvimento de diversos tipos de tumores. Por outro lado, as variantes de transcrição alternativas que codificam diferentes isoformas foram caracterizadas.



C.10) TNFRSF11A

A proteína codificada por este gene localizado no cromossoma 18q22.1 é um membro da superfamília de TNF-receptor. Este receptor pode interagir com várias proteínas da família TRAF, através do qual este receptor induz a activação de NF-kappa B e MAPK8/JNK. Este receptor e o seu ligante são importantes reguladores da interacção entre células T e células dendríticas. Este receptor é também um mediador essencial para o desenvolvimento dos osteoclastos.



D) Outros Genes Associados

D.1) CAPN10

Este gene localizado no cromossoma 2q37.3 está associado com a diabetes. Múltiplas variantes transcricionais alternativas têm sido descritas para este gene.



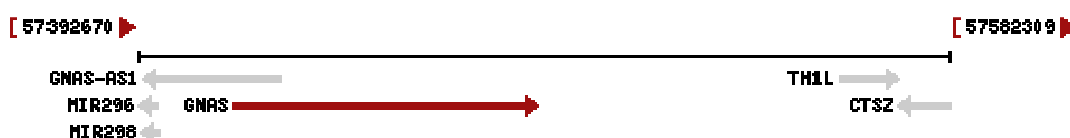
D.2) GABBR1

Ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central. GABA exerce os seus efeitos através de receptores ionotrópicos, para produzir a inibição rápida sináptica, e metabotrópicos, os receptores para produzir sinais inibidores lentos prolongados. Loci de susceptibilidade para a esclerose múltipla, a epilepsia e a esquizofrenia também foram mapeados nesta região. O splicing alternativo deste gene gera múltiplas variantes de transcritos. A sua localização topográfica no Cromossoma 6p21.31 é a seguinte:



D.3) GNAS

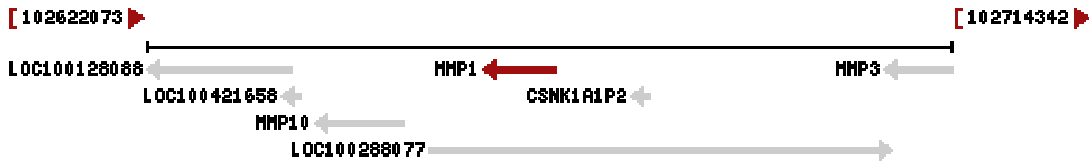
Este locus tem um padrão de expressão altamente complexo. Mutações neste gene resultam em pseudohipoparatiroidismo tipo 1a, pseudohipoparatiroidismo tipo 1b, osteodistrofia hereditária de Albright, pseudopseudohipoparatiroidismo, síndrome de McCune-Albright, heteroplasia óssea progressiva, displasia fibrosa polioestótica de osso, e alguns tumores hipofisários. A sua localização topográfica no Cromossoma 20q13.3 é a seguinte:



D.4) MMP1

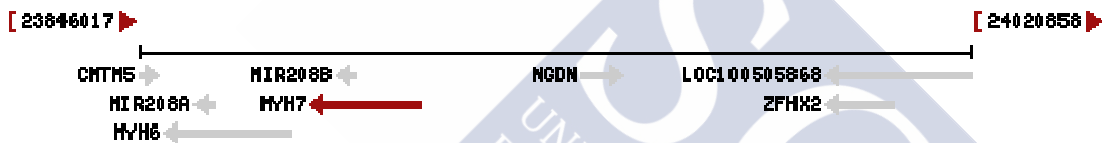
As proteínas da matriz metaloproteinase família (MMP) estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como o

desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação do tecido, bem como em processos de doenças, como artrite e metástase. A sua localização topográfica no Cromossoma 11q22.3 é a seguinte:



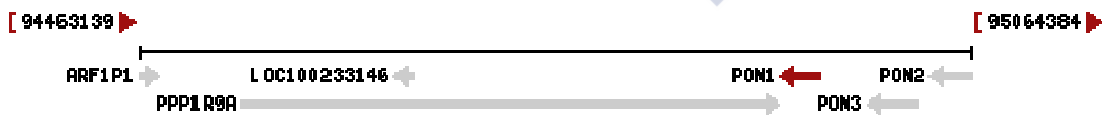
D.5) MYH6/MYH7

Estes genes localizados no cromossoma 14q12 codificam a subunidade de cadeia pesada da miosina cardíaca. Mutações nestes genes causam a cardiomiopatia hipertrófica familiar e cardiomiopatia dilatada entre outros



D.6) PON1

A enzima codificada por este gene localizado no cromossoma 7q21.3 é uma arilesterase que faz a hidrólise de paroxon principalmente para a produção de p-nitrofenol. Polimorfismos neste gene são um factor de risco para doença arterial coronária.



D.7) APOE

ApoE é essencial para o catabolismo normal dos componentes das lipoproteínas ricas em triglicédeos. A sua localização topográfica no Cromossoma 19q13.2 é a seguinte:

